

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 524**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2015** **E 20176483 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2023** **EP 3750993**

54 Título: **Métodos para mejorar la eficacia de la transducción de vectores en los linfocitos T**

30 Prioridad:

11.07.2014 US 201462023618 P

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

20.06.2024

73 Titular/es:

CELGENE CORPORATION (100.0%)
Route 206 & Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US

72 Inventor/es:

LIANG, BITAO y
LIU, WEI

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 973 524 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

Métodos para mejorar la eficacia de la transducción de vectores en los linfocitos T

5 **1. CAMPO**

La presente divulgación se refiere a métodos para mejorar la eficacia de la transducción de vectores en células.

10 **2. ANTECEDENTES**

Los linfocitos T reconocen e interactúan con antígenos específicos, incluyendo antígenos asociados a tumores o específicos de tumores. Como los linfocitos T son capaces de destruir células tumorales, en los últimos 25 años se ha observado un gran interés en dirigir células tumorales con linfocitos T, ya sean linfocitos T específicos de antígeno o linfocitos T modificados genéticamente para que expresen uno o más receptores de antígenos quiméricos (CAR; consultar, por ejemplo, Eshhar, Patente de Estados Unidos N° 7.741.465; Eshhar, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2012/0093842). Yang et al., Journal of Immunotherapy, 2010, Vol. 33, No. 6, páginas 648 a 658, trataron de establecer una metodología para la transducción de vectores lentivirales para la administración de genes y la expansión de células T CD8+. Se evaluaron agentes activadores alternativos, incluyendo células alimentadoras de células mononucleares de sangre periférica alogénicas y anticuerpo anti-CD3 unido a placa. La WO 2008/153742 se refiere de manera general a métodos y composiciones para expresar ácidos nucleicos exógenos en células, y más concretamente a la expresión de material genético exógeno en células inmunitarias humanas usando vectores adenovirales. Sutlu et al., Human Gene Therapy, 2012, Vol. 23, No. 10, páginas 1090-1100, estudiaron las condiciones para la transferencia génica lentiviral a células asesinas naturales (NK) e informaron de la estimulación de células NK con interleucina (IL)-2 e IL-21 usando un vector lentiviral pseudotipado VSV-G. En este campo se necesitan nuevos métodos para mejorar la eficacia de la derivación de CAR a partir de linfocitos T.

30 **3. SUMARIO**

La presente invención proporciona un método de transducción de un linfocito T primario como se define en las reivindicaciones.

En la presente se divulgan métodos para mejorar la eficacia de la producción de células modificadas genéticamente, por ejemplo células inmunitarias, como linfocitos T, por ejemplo linfocitos T humanos, por ejemplo linfocitos T primarios (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios). Sin querer estar limitados a ningún mecanismo o teoría en particular, se cree que el sistema inmunitario innato puede inhibir el paso de transducción viral de la producción de células T CAR y, por lo tanto, inhibiendo la actividad del sistema inmunitario innato (por ejemplo, inhibiendo la capacidad del sistema inmunitario innato de inhibir la transducción viral y/o la posterior producción de proteínas virales), puede mejorarse la derivación de células T CAR usando vectores (por ejemplo, vectores virales, por ejemplo, vectores retrovirales, por ejemplo vectores lentivirales).

Los métodos proporcionados en la presente pueden usarse junto con cualquier tipo de célula, en particular, cualquier célula de mamífero, por ejemplo, cualquier célula humana, por ejemplo, células usadas para terapéutica celular, por ejemplo, terapéutica celular humana. Ejemplos no limitativos de células en las que pueden usarse los métodos incluyen, pero no se limitan a, células asesinas naturales (NK) (por ejemplo, las células asesinas naturales intermedias placentarias divulgadas en la Patente de Estados Unidos N° 8.263.065 o en la Solicitud de Estados Unidos N° 2012/0148553), células dendríticas (DC), células madre placentarias (por ejemplo, las células madre placentarias divulgadas en las Patentes de Estados Unidos N° 7.468.276; 8.057.788 y 8.202.703), células adherentes derivadas del amnios (AMDAC) (por ejemplo, las AMDAC divulgadas en la Patente de Estados Unidos N° 8.367.409); linfocitos infiltrantes de tumores, células de empaquetamiento de virus (por ejemplo, células HEK 293T); células madre tipo mesenquimales (o células madre mesenquimales o células estromales mesenquimales) de sangre de cordón umbilical, sangre placentaria, sangre periférica, médula ósea, pulpa dental, tejido adiposo, tejido osteocondral y similares; células madre embrionarias, células germinales embrionarias, células madre de la cresta neural, células madre neurales y células diferenciadas (por ejemplo, fibroblastos, etc.). Los métodos también pueden usarse en líneas celulares tumorales, por ejemplo, con propósitos experimentales en modelos animales.

En ciertas realizaciones, los métodos descritos en la presente pueden incluir transducir (por ejemplo, transducir con un retrovirus, por ejemplo un lentivirus) células (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios). En ciertas realizaciones, los métodos descritos en la presente pueden incluir poner en contacto las células (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) con un compuesto que es un inhibidor del sistema inmunitario innato antes, concurrentemente o después de dicha transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral). En una realización particular, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) introduce en las células un ácido nucleico aislado de más de 10 kilobases. En otra realización más, el ácido nucleico aislado transducido en las células (por ejemplo, mediante transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral en linfocitos T humanos primarios), por ejemplo, un vector, por ejemplo, un vector viral, codifica una o más proteínas,

por ejemplo, codifica uno o más receptores de antígeno quimérico.

En una realización particular, el compuesto usado en los métodos descritos en la presente para entrar en contacto con dichas células (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) durante la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) es un inhibidor del sistema inmunitario innato. En una realización particular, dicho inhibidor del sistema inmunitario innato es un inhibidor de la I κ B quinasa ϵ (IKK ϵ) y/o de la quinasa de unión a TANK 1 (TBK1). En una realización específica, dicho compuesto es BX795. En una realización específica, dicho inhibidor del sistema inmunitario innato es un inhibidor de la proteína quinasa R (PKR). En una realización específica, dicho compuesto es 2-Aminopurina (2-AP).

En una realización de los métodos descritos en la presente, las células (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) se ponen en contacto con un compuesto descrito en la presente (por ejemplo, BX795 o 2-AP) antes, concurrentemente o después de la transducción con un vector, por ejemplo, un vector viral (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral). En otra realización, las células (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) se ponen en contacto con un compuesto descrito en la presente (por ejemplo, BX795 o 2-AP) 30 minutos, 60 minutos, 2 horas o 3 horas antes de la transducción con un vector viral (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral). En otra realización, las células (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) se ponen en contacto con un compuesto descrito en la presente (por ejemplo, BX795 o 2-AP) concurrentemente con la transducción con un vector viral (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) y durante un período de 2 horas, 4 horas o 6 horas a partir de entonces. En otra realización, las células (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) se ponen en contacto con un compuesto descrito en la presente (por ejemplo, BX795 2-AP) durante 30 minutos, 60 minutos, 2 horas o 3 horas antes de la transducción con un vector viral (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) y concurrentemente con la transducción (por ejemplo transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) durante un periodo de 2 horas, 4 horas o 6 horas a partir de entonces. En una realización específica, dicho compuesto descrito en la presente (por ejemplo, BX795) se usa a una concentración de 1-20 μ M. En otra realización, dicho compuesto descrito en la presente (por ejemplo, BX795) se usa a una concentración de 2,5-10 μ M. En otra realización, dicho compuesto descrito en la presente (por ejemplo, BX795) se usa a una concentración de 4-8 μ M.

En una realización, los métodos proporcionados en la presente comprenden adicionalmente poner en contacto células (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) con un reactivo de transformación (por ejemplo, dietilaminoetil-dextrano o sulfato de protamina) antes o concurrentemente con la transducción con un vector, por ejemplo, un vector viral (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral).

En una realización de los métodos descritos en la presente, las células (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) se ponen en contacto adicionalmente con un agente capaz de estimular un complejo receptor de células T antes de la transducción con un vector, por ejemplo, un vector viral (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral). En una realización particular, dicho agente es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En una realización particular, dicho anticuerpo o fragmento o fragmentos de unión a antígeno se unen específicamente a CD3 y/o CD28. En una realización particular, dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno está acoplado a un sustrato sólido (por ejemplo, Dynabeads®). En otra realización particular, dicho anticuerpo o fragmento o fragmentos de unión a antígeno (por ejemplo, anti-CD3 y/o anti-CD28) no están presentes en una superficie sólida, por ejemplo, la misma superficie sólida, sino que están presentes en solución, o formando complejos con otro compuesto o composición que permite la presentación del anticuerpo o fragmento o fragmentos de unión a antígeno a la célula, por ejemplo, el anticuerpo o fragmento o fragmentos de unión a antígeno forman complejos con un polímero, hidrogel, albúmina, y/o una molécula hidrófoba. En ciertas realizaciones, la molécula con la que forman complejos el anticuerpo o el fragmento o fragmentos de unión a antígeno no es un adyuvante. En otra realización, dicho contacto se produce por lo menos 48 horas, por lo menos 44 horas, por lo menos 40 horas, por lo menos 36 horas, por lo menos 32 horas, por lo menos 28 horas, por lo menos 24 horas, por lo menos 20 horas, por lo menos 16 horas, por lo menos 12 horas, por lo menos 8 horas o por lo menos 4 horas antes de la transducción de dichas células con un vector, por ejemplo un vector viral (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral).

En una realización particular de los métodos descritos en la presente, las células (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) se transducen con un virus (por ejemplo, un retrovirus, por ejemplo un lentivirus) a una multiplicidad de infección (MOI) de 1,5 a 3,0.

En una realización específica, se proporciona en la presente un método de transducción de linfocitos T primarios (por ejemplo, linfocitos T primarios humanos), que comprende: poner en contacto linfocitos T primarios con i) un vector viral (por ejemplo, vector retroviral, por ejemplo un vector lentiviral) que comprende un ácido nucleico y ii) un compuesto que es un inhibidor del sistema inmunitario innato, de tal manera que el ácido nucleico se transduce en los linfocitos T. En otra realización específica, dicho contacto de dichos linfocitos T primarios con dicho compuesto se produce antes (por ejemplo, 30 minutos antes, 1 hora antes, 2 horas antes, 3 horas antes, 4 horas antes, 6 horas antes, 7 horas antes, 8 horas antes, 9 horas antes o 10 horas antes) y/o concurrentemente con el contacto de dichos linfocitos T con dicho vector viral. En otra realización específica, dicho vector viral comprende un ácido nucleico que codifica una o más proteínas, por ejemplo, uno o más receptores de antígenos quiméricos (CAR).

En otra realización específica, dicho compuesto inhibe la actividad de IκB quinasa ε (IKK ε) o quinasa 1 de unión a TANK (TBK1). En otra realización específica, dicho compuesto que inhibe la actividad de la IκB quinasa ε (IKK ε) o quinasa 1 de unión a TANK (TBK1) es BX795 (por ejemplo, BX795 1μM, 2μM, 3μM, 4μM, 5μM, 6μM, 7μM, 8μM, 9μM o 10μM). En otra realización específica, dicho compuesto inhibe la actividad de la proteína quinasa R (PKR). En otra realización específica, dicho compuesto que inhibe la actividad de la proteína quinasa R (PKR) es 2-aminopurina (2-AP) (por ejemplo, 2-AP 1mM, 2mM, 2,5mM, 3mM, 4mM, 5mM, 6mM, 7mM, 8mM, 9mM o mM 10mM).

En otra realización específica, el método de transducción de linfocitos T primarios comprende además poner en contacto dichos linfocitos T primarios con un agente capaz de estimular un complejo receptor de células T antes de poner en contacto los linfocitos T primarios con el vector viral. En una realización específica, dicho agente es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 y/o CD28. En otra realización específica, el método de transducción de linfocitos T primarios comprende además poner en contacto los linfocitos T primarios con un reactivo de transformación (por ejemplo, dietilaminoetil-dextrano o sulfato de protamina) y, opcionalmente, una citoquina (por ejemplo, interleucina 2 (IL-2), interleucina 7 (IL-7), interleucina 12 (IL-12), interleucina 15 (IL-15) o interleucina 21 (IL-21)).

En otra realización específica, se proporciona en la presente un método de transducción de linfocitos T primarios (por ejemplo, linfocitos T primarios humanos), que comprende: poner en contacto linfocitos T primarios humanos, en presencia de dietilaminoetil-dextrano o sulfato de protamina e interleucina 2, con i) un vector retroviral, por ejemplo un vector lentiviral que comprende un ácido nucleico que codifica una o más proteínas, por ejemplo, uno o más receptores de antígeno quimérico, y ii) BX795 (por ejemplo, BX795 6μM), de tal manera que el ácido nucleico se transduce en los linfocitos T. En una realización específica, dicho contacto de dichos linfocitos T primarios con BX795 se produce antes (por ejemplo, 3 horas antes, 6 horas antes) y/o concurrentemente con el contacto de dichos linfocitos T con dicho vector viral. En otra realización específica, dicho vector comprende un ácido nucleico que codifica uno o más receptores de antígenos quiméricos.

En otra realización específica, se proporciona en la presente un método de transducción de linfocitos T primarios (por ejemplo, linfocitos T primarios humanos), que comprende: poner en contacto linfocitos T primarios humanos, en presencia de dietilaminoetil-dextrano o sulfato de protamina e interleucina 2 (IL-2), con i) un vector retroviral, por ejemplo un vector lentiviral que comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico y ii) BX795 6μM, en donde el contacto de los linfocitos T primarios humanos con BX795 6μM se produce durante aproximadamente 3 horas, seguido de por lo menos 6 horas de contacto simultáneo de los linfocitos T primarios humanos con el vector viral y BX795 6μM, de tal manera que el ácido nucleico se transduce en los linfocitos T. En otra realización específica, dicho vector comprende un ácido nucleico que codifica uno o más receptores de antígenos quiméricos.

En otra realización específica, se proporciona en la presente un método de transducción de linfocitos T primarios (por ejemplo, linfocitos T primarios humanos), que comprende: poner en contacto linfocitos T primarios humanos, en presencia de dietilaminoetil-dextrano o sulfato de protamina e interleucina 2, con i) un vector retroviral, por ejemplo un vector lentiviral que comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico y ii) 2-AP (por ejemplo, 2-AP 2,5-10 mM), de tal manera que el ácido nucleico se transduce en los linfocitos T. En una realización específica, dicho contacto de dichos linfocitos T primarios con 2-AP se produce antes (por ejemplo, 90 minutos antes, 2 horas antes o 3 horas antes) y/o concurrentemente con el contacto de dichos linfocitos T con dicho vector viral. En otra realización específica, dicho vector comprende un ácido nucleico que codifica uno o más receptores de antígenos quiméricos.

En otra realización específica, se proporciona en la presente un método de transducción de linfocitos T primarios (por ejemplo, linfocitos T primarios humanos), que comprende: poner en contacto linfocitos T primarios humanos, en presencia de dietilaminoetil-dextrano o sulfato de protamina e interleucina 2, con i) un vector retroviral, por ejemplo un vector lentiviral que comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico y ii) 2-AP 2,5-10 mM, en donde el contacto de los linfocitos T primarios humanos con 2-AP 2,5-10 mM se produce durante 90 minutos, seguido de por lo menos 5 horas de contacto concurrente de los linfocitos T primarios humanos con el vector viral y el 2-AP 2,5-10 mM, de tal manera que el ácido nucleico se transduce en los linfocitos T. En otra realización específica, dicho vector comprende un ácido nucleico que codifica uno o más receptores de antígenos quiméricos.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1A y 1B muestran los efectos del tratamiento concurrente de DEAE-dextrano solo (Figura 1A) o con BX795 en presencia de DEAE-dextrano (Figura 1B, a concentraciones de 1 μM, 2 μM, 4 μM, 6 μM, 8 μM y 10 μM) sobre la eficacia de transducción de linfocitos T primarios usando lentivirus que codifican receptores de antígenos quiméricos.

La Figura 2 muestra los efectos del tratamiento con BX795 sobre la eficacia de la transducción lentiviral. Se evaluó la eficacia de la transducción de linfocitos T primarios transducidos con lentivirus que codifican receptores de

antígenos quiméricos en distintas condiciones: (i) pretratamiento con BX795, (ii) tratamiento concurrente con BX795, (iii) una combinación de pretratamiento con BX795 y tratamiento concurrente y (iv) tratamiento de control.

Las Figuras 3A y 3B muestran los efectos de los reactivos de transformación DEAE-dextrano y sulfato de protamina sobre la viabilidad de linfocitos T humanos primarios (Figura 3A) y los efectos de varias concentraciones de 2-AP en presencia de DEAE-dextrano o sulfato de protamina sobre la viabilidad de linfocitos T humanos primarios transducidos con lentivirus (Figura 3B).

Las Figuras 4A y 4B muestran la eficacia de la transducción lentiviral en ausencia de 2-AP (Figura 4A) o en presencia de concentraciones crecientes de 2-AP (Figura 4B a concentraciones de 2,5 mM, 5 mM o 10 mM).

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA

5.1. Métodos de transducción

5.1.1. Células

Ejemplos no limitativos de células que pueden usarse en los métodos descritos en la presente incluyen linfocitos T, células dendríticas (CD), células madre placentarias (por ejemplo, las células madre placentarias divulgadas en las Patentes de Estados Unidos N° 7,468,276; 8,057,788 y 8,202,703, cuyas divulgaciones se incorporan por referencia en la presente en su totalidad), células madre tipo mesenquimales de la sangre del cordón umbilical, sangre placentaria, sangre periférica, médula ósea, pulpa dental, tejido adiposo, tejido osteocondral, y similares; células madre embrionarias, células germinales embrionarias, células madre de la cresta neural, células madre neurales, y células diferenciadas (por ejemplo, fibroblastos, etc.). Los métodos también pueden usarse en líneas celulares tumorales, por ejemplo, con propósitos experimentales en modelos animales. En una realización particular, las células de los métodos descritos en la presente pueden ser células primarias. Las células primarias son bien conocidas en la técnica y pueden incluir células extraídas de un sujeto (por ejemplo, un humano) que se cultivan o expanden in vitro durante un periodo de tiempo que no lleva a la aparición de senescencia celular, y no se cultivan o expanden de una manera que lleva a la inmortalización de las células. En una realización específica, las células usadas en los métodos descritos en la presente son linfocitos T humanos. En otra realización específica, las células usadas en los métodos descritos en la presente no son células asesinas naturales. En otra realización específica, las células usadas en los métodos descritos en la presente no son líneas celulares de linfocitos T.

En una realización específica, las células usadas en los métodos descritos en la presente son linfocitos T primarios (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios). Los linfocitos T primarios usados en los métodos proporcionados en la presente pueden ser linfocitos T vírgenes o linfocitos T con MHC restringido. En ciertas realizaciones, los linfocitos T son CD4⁺. En otras realizaciones, los linfocitos T son CD8⁺. En ciertas realizaciones, los linfocitos T primarios son linfocitos infiltrantes de tumores (TIL). En ciertas realizaciones, los linfocitos T primarios se han aislado de una biopsia tumoral, o se han expandido a partir de linfocitos T aislados de una biopsia tumoral. En ciertas realizaciones, los linfocitos T primarios se han aislado de, o se han expandido a partir de linfocitos T aislados de, sangre periférica, sangre de cordón umbilical o linfa. En ciertas realizaciones, los linfocitos T son alogénicos con respecto a un individuo particular, por ejemplo, un receptor de dichos linfocitos T. En algunas otras realizaciones, los linfocitos T no son alogénicos con respecto a un individuo particular, por ejemplo, un receptor de dichos linfocitos T. En ciertas realizaciones, los linfocitos T son autólogos con respecto a un individuo particular, por ejemplo, un receptor de dichos linfocitos T.

En una realización, los linfocitos T primarios se obtienen de un individuo, opcionalmente se expanden, y después se transducen, usando los métodos descritos en la presente, con un ácido nucleico que codifica uno o más receptores de antígenos quiméricos (CAR), y opcionalmente después se expanden. Consultar la Sección 5.2. Los linfocitos T pueden expandirse, por ejemplo, poniendo en contacto los linfocitos T en cultivo con anticuerpos contra CD3 y/o CD28, por ejemplo, anticuerpos unidos a perlas, o a la superficie de una placa de cultivo celular; consultar, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.948.893; 6.534.055; 6.352.694; 6.692.964; 6.887.466; y 6.905.681. En realizaciones específicas, los anticuerpos son anti-CD3 y/o anti-CD28, y los anticuerpos no están unidos a una superficie sólida (por ejemplo, los anticuerpos entran en contacto con los linfocitos T en solución). En otras realizaciones específicas, cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 o anti-CD28 está unido a una superficie sólida (por ejemplo, perla, plástico de placas de cultivo de tejidos), y el otro anticuerpo no está unido a una superficie sólida (por ejemplo, está presente en solución).

En ciertas realizaciones, los linfocitos T primarios usados en los métodos descritos en la presente se aíslan de un tumor, por ejemplo, son linfocitos infiltrantes de tumores. En realizaciones particulares, tales linfocitos T son específicos para un antígeno específico de tumor (TSA) o un antígeno asociado a tumor (TAA). Consultar la Sección 5.2.2.

5.1.2. Reactivos de transformación

Como se usa en la presente, los términos "transducción", "transformación" y "transfección" se usan indistintamente, a menos que se indique lo contrario. Los métodos de transducción de células son bien conocidos en la técnica. Durante la transducción, pueden añadirse, por ejemplo, moléculas pequeñas y/o polímeros a los cultivos celulares para facilitar la unión y/o captación de las proteínas y/o ácidos nucleicos de interés. En particular, pueden añadirse pequeños compuestos polares a las condiciones de cultivo para facilitar la unión y transducción de virus y ácido o ácidos nucleicos en los mismos. Los reactivos de transformación ejemplares incluyen, sin limitación, Lipofectamine®, FuGENE®, fosfato de calcio, dietilaminoetilcelulosa-dextrano (DEAE-dextrano o DD) y sulfato de protamina. En ciertas realizaciones de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) se produce en presencia del DEAE-dextrano o sulfato de protamina. En realizaciones particulares de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) se produce en presencia de DEAE-dextrano, por ejemplo, 10 µg/ml de DEAE-dextrano, o sulfato de protamina, por ejemplo, 10 µg/ml de sulfato de protamina.

5.1.3. Condiciones de cultivo y activación de linfocitos T

Las células descritas en la presente pueden mantenerse en condiciones de cultivo específicas para facilitar o mejorar la transducción (por ejemplo, la transducción viral). En una realización particular, los linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) se activan mediante un antígeno o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a una molécula coestimuladora de linfocitos T (por ejemplo, CD28, CD3 y/o CD45) antes o concurrentemente con la transducción. En otra realización, dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se acopla a un sustrato sólido (por ejemplo, Dynabeads®). En una realización particular, los linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) se estimulan con anticuerpos anti-CD3, anti-CD28 y/o anti-CD45, o fragmento o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, acoplados a Dynabeads® durante 24 horas antes de la transducción (por ejemplo, transducción viral). En otra realización particular, dicho anticuerpo o fragmento o fragmentos de unión a antígeno (por ejemplo, de anticuerpos anti-CD3, anti-CD28 y/o anti-CD45 o fragmento o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) no están presentes en un sustrato sólido, sino que forman complejos con otro compuesto o composición que permite la presentación del anticuerpo o fragmento o fragmentos de unión a antígeno a la célula, por ejemplo, el anticuerpo o fragmento o fragmentos de unión a antígeno forman complejos con un polímero, hidrogel, albúmina y/o una molécula hidrófoba. En realizaciones particulares, dicha molécula o moléculas que forman complejos con el anticuerpo o fragmento o fragmentos de unión a antígeno del mismo no es un adyuvante. En otra realización, dicho contacto se produce por lo menos 48 horas, por lo menos 44 horas, por lo menos 40 horas, por lo menos 36 horas, por lo menos 32 horas, por lo menos 28 horas, por lo menos 24 horas, por lo menos 20 horas, por lo menos 16 horas, por lo menos 12 horas, por lo menos 8 horas o por lo menos 4 horas antes de la transducción de dichas células con un vector viral (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral). En otra realización más, dicho contacto se produce por lo menos de 48 horas a 40 horas, de 44 horas a 36 horas, de 40 horas a 32 horas, de 36 horas a 28 horas, de 32 horas a 24 horas, de 28 horas a 20 horas, de 24 horas a 16 horas, de 20 horas a 12 horas, de 16 horas a 8 horas, de 12 horas a 4 horas o por lo menos de 8 horas a 1 hora antes de la transducción de dichas células con un vector viral (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral).

En otra realización, pueden añadirse citoquinas y/o factores de crecimiento que estimulen la activación y/o proliferación de linfocitos T antes o concurrentemente con la transducción. En una realización particular, se añade interleucina 2 (IL-2), por ejemplo, 50 U/ml de IL-2, a los cultivos de linfocitos T (por ejemplo, cultivos primarios de linfocitos T humanos) antes o concurrentemente con la transducción (por ejemplo, transducción viral). En otra realización, se añade interleucina 7 (IL-7), por ejemplo, 10 ng/ml de IL-7, a cultivos de linfocitos T (por ejemplo, cultivos primarios de linfocitos T humanos) antes o concurrentemente con la transducción (por ejemplo, transducción viral). En otra realización, se añade interleucina 12 (IL-12), por ejemplo, 10 ng/ml de IL-12, a cultivos de linfocitos T (por ejemplo, cultivos primarios de linfocitos T humanos) antes o concurrentemente con la transducción (por ejemplo, transducción viral). En otra realización, se añade interleucina 15 (IL-15), por ejemplo, 10 ng/ml de IL-15, a cultivos de linfocitos T (por ejemplo, cultivos primarios de linfocitos T humanos) antes o concurrentemente con la transducción (por ejemplo, transducción viral). En otra realización, se añade interleucina 21 (IL-21), por ejemplo, 25 ng/ml de IL-21 a cultivos de linfocitos T (por ejemplo, cultivos primarios de linfocitos T humanos) antes o concurrentemente con la transducción (por ejemplo, transducción viral).

5.1.4. Inhibidores de la inmunidad innata

El sistema inmunitario innato puede reprimir la expresión de genes de virus, incluyendo los virus sintéticos. Es bien conocido en la técnica que el sistema inmunitario innato comprende proteínas (por ejemplo, el gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I), la proteína quinasa R (PKR), la IκB quinasa ε (IKK ε), la quinasa de unión a TANK 1 (TBK1)) que pueden ser desencadenadas por ARN de cadena doble y otras macromoléculas patógenas, y que la actividad inmunitaria innata puede medirse fácilmente (por ejemplo, niveles secretados de proteínas de interferón que incluyen, entre otras, interferón-α, interferón-β, interferón-δ, interferón-ζ, interferón-κ e interferón-τ). Por consiguiente, en una realización particular de los métodos descritos en la presente, las células cultivadas se ponen en contacto con un inhibidor de la inmunidad innata. En otra realización, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) puede potenciarse mediante la

adición de compuestos, por ejemplo moléculas pequeñas, que inhiben la señalización inmunitaria innata (por ejemplo, BX795, Piceatannol, Gefitinib, Z-VAD-FMK, Glibenclamida, Pepinh-MyD, OxPAPC, CLI-095, Polimixina B, H-89, 2-Aminopurina (2-AP), Cloroquina, Bafilomicina A1 o similares).

En ciertas realizaciones de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) puede mejorarse poniendo en contacto los linfocitos T con un inhibidor de la respuesta inmunitaria innata antes, concurrentemente o después de la transducción. En una realización específica de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) puede potenciarse al tratarlos con un inhibidor de la I κ B quinasa ϵ (IKK ϵ) y/o la quinasa 1 de unión a TANK (TBK1) antes, concurrentemente o después de la transducción. En otra realización específica de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) puede mejorarse tras el tratamiento con BX795 antes, concurrentemente o después de la transducción de las células.

En una realización específica de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) puede potenciarse tras el tratamiento con BX795 a una concentración de 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 9 μ M, 10 μ M, 11 μ M, 12 μ M, 13 μ M, 14 μ M, 15 μ M, 16 μ M, 17 μ M, 18 μ M, 19 μ M, 20 μ M, o mayor. En otra realización específica de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) puede potenciarse tras el tratamiento con BX795 a una concentración de 0.5 μ M a 1 μ M, 1 μ M a 3 μ M, 2 μ M a 4 μ M, 3 μ M a 5 μ M, 4 μ M a 6 μ M, 5 μ M a 7 μ M, 6 μ M a 8 μ M, 7 μ M a 9 μ M, 8 μ M a 10 μ M, 9 μ M a 11 μ M, 10 μ M a 12 μ M, 11 μ M a 13 μ M, 12 μ M a 14 μ M o 13 μ M a 15 μ M, 10 μ M a 20 μ M, 10 μ M a 15 μ M o 10 μ M a 12 μ M.

En ciertas realizaciones de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) puede mejorarse tras el tratamiento con BX795 antes de la transducción de las células. Por ejemplo, en ciertas realizaciones de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) puede potenciarse tras el tratamiento con BX795 durante más de 5 horas antes de la transducción, 5 horas antes de la transducción, 4 horas antes de la transducción, 3 horas antes de la transducción, 2 horas antes de la transducción, 1 hora antes de la transducción, 30 minutos antes de la transducción, 15 minutos antes de la transducción, 5 minutos antes de la transducción o concurrentemente con la transducción. En una realización específica de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) puede potenciarse tras el tratamiento con BX795 de 4 a 5 horas antes de la transformación, de 3 a 4 horas antes de la transducción, de 2 a 3 horas antes de la transducción, de 1 a 2 horas antes de la transducción, de 30 minutos a 1 hora antes de la transducción o concurrentemente a 30 minutos antes de la transducción. En una realización específica de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) puede mejorarse tras el tratamiento con BX795 tanto antes como concurrentemente con la transducción en cualquiera de los puntos temporales descritos en la presente.

En una realización específica, dicho inhibidor del sistema inmunitario innato es un inhibidor de la proteína quinasa R (PKR). En una realización específica de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) puede mejorarse tras el tratamiento con un inhibidor de la proteína quinasa R (PKR) antes, concurrentemente o después de la transducción. En una realización específica, dicho compuesto es 2-Aminopurina (2-AP).

En ciertas realizaciones de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) puede mejorarse tras el tratamiento de los linfocitos T con un inhibidor de la respuesta inmunitaria innata antes, concurrentemente o después de la transducción. En una realización específica de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) puede mejorarse con el tratamiento con un inhibidor de la proteína quinasa R (PKR) antes, concurrentemente o después de la transducción. En otra realización específica de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) puede potenciarse con el tratamiento con 2-AP antes, concurrentemente o después de la transducción de las células.

En una realización específica de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) puede potenciarse tras el tratamiento con 2-AP a una concentración de 0,5mM, 1mM, 2mM, 3mM, 4mM, 5mM, 6mM, 7mM, 8mM, 9mM, 10mM, 11mM, 12mM, 13mM, 14mM, 15mM o mayor. En otra realización específica de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de

linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) puede potenciarse tras el tratamiento con 2-AP a una concentración de 0,5 mM a 1mM, de 1mM a 3mM, de 2mM a 4mM, de 3mM a 5mM, de 4mM a 6mM, de 5mM a 7mM, de 6mM a 8mM, de 7mM a 9mM, de 8mM a 10mM, de 9mM a 11mM, de 10mM a 12mM, de 11mM a 13mM, de 12mM a 14mM o de 13mM a 15mM.

En ciertas realizaciones de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) puede potenciarse tras el tratamiento con 2-AP antes de la transducción de las células. Por ejemplo, en ciertas realizaciones de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) puede potenciarse tras el tratamiento con 2-AP durante más de 5 horas antes de la transducción, 5 horas antes de la transducción, 4 horas antes de la transducción, 3 horas antes de la transducción, 2 horas antes de la transducción, 1 hora antes de la transducción, 30 minutos antes de la transducción, 15 minutos antes de la transducción, 5 minutos antes de la transducción o concurrentemente con la transducción. En una realización específica de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) puede potenciarse tras el tratamiento con 2-AP de 4 a 5 horas antes de la transducción, de 3 a 4 horas antes de la transducción, de 2 a 3 horas antes de la transducción, de 1 a 2 horas antes de la transducción, de 30 minutos a 1 hora antes de la transducción o concurrentemente a 30 minutos antes de la transducción. En una realización específica de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) puede potenciarse tras el tratamiento con 2-AP tanto antes como concurrentemente con la transducción en cualquiera de los puntos temporales descritos en la presente.

5.1.5. Transducción vírica

En una realización de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) puede producirse usando virus a varias multiplicidades de infección (MOI). En una realización específica de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) se produce a una multiplicidad de infección viral (MOI) de 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3,0 o mayor. En una realización específica de los métodos descritos en la presente, la transducción (por ejemplo, transducción retroviral, por ejemplo transducción lentiviral) de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) se produce a una multiplicidad de infección viral (MOI) de 0,1 a 0,3, de 0,2 a 0,4, de 0,4 a 0,6, de 0,6 a 0,8, de 0,8 a 1,0, de 1,0 a 1,2, de 1,2 a 1,4, de 1,4 a 1,6, de 1,6 a 1,8, de 1,8 a 2,0, de 2,0 a 2,2, de 2,2 a 2,4, de 2,4 a 2,6, de 2,6 a 2,8 o de 2,8 a 3,0.

En una realización específica de los métodos descritos en la presente, el contacto de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) con un compuesto (por ejemplo, BX795 o 2-AP) para aumentar la eficacia de transducción (por ejemplo, eficacia de transducción lentiviral) mejora la transducción de secuencias de ácidos nucleicos aisladas (por ejemplo, vectores que codifican receptores de antígeno quimérico). Por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos de 9 kilobases (kb) de longitud, 10 kb de longitud, 11 kb de longitud, 12 kb de longitud, 13 kb de longitud, 14 kb de longitud, 15 kb de longitud, 16 kb de longitud, 17 kb de longitud o 18 kb de longitud o más pueden transducirse en células con mayor eficacia como resultado de los métodos descritos en la presente (es decir, en comparación con la eficacia de transducción en ausencia de un compuesto descrito (por ejemplo, BX795 o 2-AP)). En ciertas realizaciones, los métodos descritos en la presente dan como resultado una transducción mejorada de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, vectores, por ejemplo, vectores virales como vectores retrovirales, por ejemplo, lentivirales, incluyendo vectores que codifican una o más proteínas, por ejemplo, uno o más receptores de antígenos quiméricos), en donde dichas moléculas de ácido nucleico tienen de 9 kilobases (kb) de longitud a 10 kb de longitud, de 10 kb de longitud a 11 kb de longitud, de 11 kb de longitud a 12 kb de longitud, de 12 kb de longitud a 13 kb de longitud, de 13 kb de longitud a 14 kb de longitud, de 14 kb de longitud a 15 kb de longitud, de 15 kb de longitud a 16 kb de longitud, de 16 kb de longitud a 17 kb de longitud, de 17 kb de longitud a 18 kb de longitud, o de 9 a 18 kb de longitud o de 10 a 15 kb de longitud.

En un aspecto particular de los métodos descritos en la presente, los linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) pueden transducirse (por ejemplo, transducir un retrovirus, por ejemplo un lentivirus) con dos o más ácidos nucleicos aislados diferentes, por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco ácidos nucleicos de secuencia no idéntica. En una realización específica, el contacto de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos primarios) con un compuesto para aumentar la eficacia de transducción (por ejemplo, eficacia de transducción retroviral, por ejemplo, eficacia de transducción lentiviral) mejora la transducción de uno, dos, tres, cuatro o cinco ácidos nucleicos aislados diferentes (por ejemplo, vectores, por ejemplo, vectores virales, como vectores retrovirales, por ejemplo, lentivirales, incluyendo vectores que codifican una o más proteínas, por ejemplo, codifican uno o más receptores quiméricos de antígenos).

En una realización específica de los métodos descritos en la presente, se estimulan linfocitos T humanos primarios durante 24 horas con anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28, o fragmento o fragmentos de unión a antígeno de

los mismos, en presencia de 50U/ml de IL-2 y 10 µg/ml de DEAE-Dextrano, seguido de tratamiento de dichos linfocitos con BX795 durante 3 horas, seguido de transducción lentiviral de dichos linfocitos, en donde el virus está a una multiplicidad de infección (MOI) de 18 y en donde los linfocitos T humanos se tratan con 6 µM de BX795 concurrentemente con la adición del lentivirus durante un período adicional de 6 horas.

En una realización específica de los métodos descritos en la presente, se estimulan linfocitos T humanos primarios durante 24 horas con anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28, o fragmento o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, en presencia de 50U/ml de IL-2 y 10 µg/ml de DEAE-Dextrano, seguido de tratamiento de dichos linfocitos con 2-AP durante 5 horas, seguido de transducción lentiviral de dichos linfocitos, en donde el virus se encuentra a una multiplicidad de infección (MOI) de 18 y en donde los linfocitos T humanos se tratan con 2,5-10 mM de 2-AP concurrentemente con la adición del lentivirus durante un período adicional de 5 horas.

En una realización específica de los métodos descritos en la presente, se estimulan linfocitos T humanos primarios durante 24 horas con anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28, o fragmento o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, en presencia de 50U/ml de IL-2 y 10 µg/ml de sulfato de protamina, seguido de tratamiento de dichos linfocitos con BX795 durante 6 horas, seguido de transducción lentiviral de dichos linfocitos, en donde el virus está a una multiplicidad de infección (MOI) de 18 y en donde los linfocitos T humanos se tratan con 6 µM de BX795 concurrentemente con la adición del lentivirus durante un período adicional de 6 horas.

En una realización específica de los métodos descritos en la presente, se estimulan linfocitos T humanos primarios durante 24 horas con anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28, o fragmento o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, en presencia de 50U/ml de IL-2 y 10 µg/ml de sulfato de protamina, seguido de tratamiento de dichos linfocitos con 2-AP durante 5 horas, seguido de transducción lentiviral de dichos linfocitos, en donde el virus se encuentra a una multiplicidad de infección (MOI) de 18 y en donde los linfocitos T humanos se tratan con 2,5-10 mM de 2-AP concurrentemente con la adición del lentivirus durante un período adicional de 5 horas.

5.2. Receptores de antígenos quiméricos

De acuerdo con la invención, los métodos proporcionados en la presente se usan para transducir un ácido nucleico que codifica uno o más receptores de antígenos quiméricos (CAR) que comprenden un dominio extracelular en una célula, por ejemplo, un linfocito T (por ejemplo, un linfocito T primario). Los CAR son proteínas artificiales unidas a la membrana que dirigen a un linfocito T hacia un antígeno y estimulan al linfocito T para que elimine las células que muestran el antígeno. Consultar, por ejemplo, Eshhar, Patente de Estados Unidos Nº 7.741.465. En general, los CAR comprenden un dominio extracelular que se une a un antígeno, por ejemplo, un antígeno en una célula, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular (citoplasmático) que transmite una señal de activación primaria a una célula inmunitaria. Si se cumplen todas las demás condiciones, cuando un CAR se expresa en la superficie de, por ejemplo, un linfocito T, y el dominio extracelular del CAR se une a un antígeno, el dominio de señalización intracelular transmite una señal al linfocito T para que se active y/o prolifere y, si el antígeno está presente en una superficie celular, para que mate a la célula que expresa el antígeno. Como los linfocitos T necesitan dos señales, una señal de activación primaria y una señal costimuladora, para activarse al máximo, los CAR pueden comprender un dominio estimulador y un dominio costimulador, de tal manera que la unión del antígeno al dominio extracelular dé como resultado la transmisión tanto de una señal de activación primaria como de una señal costimuladora.

5.2.1. Estructura general de la CAR Dominio intracelular

En ciertas realizaciones, el dominio intracelular del CAR es o comprende un dominio o motivo intracelular de una proteína que se expresa en la superficie de los linfocitos T y desencadena la activación y/o proliferación de dichos linfocitos T. Dicho dominio o motivo es capaz de transmitir una señal primaria de unión a antígeno que es necesaria para la activación de un linfocito T en respuesta a la unión del antígeno a la porción extracelular del CAR. Dicho dominio o motivo es capaz de transmitir una señal primaria de unión a antígeno que es necesaria para la activación de un linfocito T en respuesta a la unión del antígeno a la porción extracelular del CAR. Típicamente, este dominio o motivo comprende, o es, un ITAM (motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora). Los polipéptidos que contienen ITAM adecuados para CAR incluyen, por ejemplo, la cadena zeta CD3 (CD3ζ) o porciones de la misma que contienen ITAM. En una realización específica, el dominio intracelular es un dominio de señalización intracelular CD3ζ. En otras realizaciones específicas, el dominio intracelular es de una cadena receptora de linfocitos, una proteína del complejo TCR/CD3, una subunidad del receptor Fc o una subunidad del receptor IL-2.

En ciertas realizaciones, el CAR comprende adicionalmente uno o más dominios o motivos coestimuladores, por ejemplo, como parte del dominio intracelular del polipéptido. El uno o más dominios o motivos coestimuladores pueden, por ejemplo, ser, o comprender, uno o más de una secuencia polipeptídica de CD27 coestimuladora, una secuencia polipeptídica de CD28 coestimuladora, una secuencia polipeptídica de OX40 (CD134) coestimuladora, una secuencia polipeptídica de 4-1BB (CD137 coestimuladora), o una secuencia polipeptídica coestimuladora inducible de células T coestimuladoras (ICOS), u otro dominio o motivo coestimulador, o cualquier combinación de los mismos.

La región transmembrana puede ser cualquier región transmembrana que pueda incorporarse a un CAR funcional, por ejemplo, una región transmembrana de una molécula de CD4 o CD8.

En ciertas realizaciones, el dominio intracelular puede modificarse adicionalmente para codificar una proteína detectable, por ejemplo, fluorescente (por ejemplo, proteína fluorescente verde) o cualquier variante conocida de la misma.

5.2.2. Dominio extracelular CAR

En ciertas realizaciones, el ácido nucleico transducido en células usando los métodos descritos en la presente comprende una secuencia que codifica un polipéptido, en donde el dominio extracelular del polipéptido se une a un antígeno de interés. En ciertas realizaciones, el dominio extracelular comprende un receptor, o una porción de un receptor, que se une a dicho antígeno. En ciertas realizaciones, el dominio extracelular comprende, o es, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo. En realizaciones específicas, el dominio extracelular comprende, o es, un dominio Fv de cadena sencilla. El dominio Fv de cadena sencilla puede comprender, por ejemplo, un VL unido a VH por un conector flexible, en donde dicho VL y VH son de un anticuerpo que se une a dicho antígeno.

El antígeno al que se une el dominio extracelular del polipéptido puede ser cualquier antígeno de interés, por ejemplo, puede ser un antígeno de una célula tumoral. La célula tumoral puede ser, por ejemplo, una célula de un tumor sólido, o una célula de un cáncer de la sangre. El antígeno puede ser cualquier antígeno que se exprese en una célula de cualquier tipo de tumor o cáncer, por ejemplo, células de un linfoma, un cáncer de pulmón, un cáncer de mama, un cáncer de próstata, un carcinoma adrenocortical, un carcinoma de tiroides, un carcinoma nasofaríngeo, un melanoma, por ejemplo, un melanoma maligno, un carcinoma cutáneo, un carcinoma colorrectal, un tumor desmoide, un tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, un tumor endocrino, un sarcoma de Ewing, un tumor neuroectodérmico primitivo periférico, un tumor sólido de células germinales, un hepatoblastoma, un neuroblastoma, un sarcoma de tejidos blandos no rhabdomyosarcoma, un osteosarcoma, un retinoblastoma, un rhabdomyosarcoma, un tumor de Wilms, un glioblastoma, un mixoma, un fibroma, un lipoma, o similares. En realizaciones más específicas, dicho linfoma puede ser leucemia linfocítica crónica (linfoma linfocítico pequeño), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmocítico, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma esplénico de zona marginal, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma, linfoma extraganglionar de células B de la zona marginal, linfoma 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 primaria, linfoma de Burkitt, leucemia prolinfocítica de linfocitos T, leucemia linfocítica granular de linfocitos T, leucemia agresiva de células NK, leucemia/linfoma de linfocitos T del adulto, linfoma extranodal de linfocitos NK/T, tipo nasal, linfoma de linfocitos T tipo enteropatía, linfoma de linfocitos T hepatoesplénico, linfoma blástico de células NK, micosis fungoide, síndrome de Sezary, linfoma anaplásico cutáneo primario de células grandes, papulosis linfomatoide, linfoma angioinmunoblástico de linfocitos T, linfoma periférico de linfocitos T (no especificado), linfoma anaplásico de células grandes, linfoma de Hodgkin o linfoma no Hodgkin. En una realización específica, en la que el cáncer es una leucemia linfocítica crónica (LLC), las células B de la LLC tienen un cariotipo normal. En otras realizaciones específicas, en las que el cáncer es leucemia linfocítica crónica (LLC), las células B de la LLC presentan una delección 17p, una delección 11q, una trisomía 12q, una delección 13q o una delección p53.

En ciertas realizaciones, el antígeno es un antígeno asociado a tumor (TAA) o un antígeno específico de tumor (TSA). En varias realizaciones específicas, sin limitación, el antígeno asociado a tumor o el antígeno específico de tumor es el antígeno de maduración de células B (BCMA), el factor de activación de células B (BAFF), Her2, el antígeno de células madre de próstata (PSCA), el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), la alfa-fetoproteína (AFP), el antígeno carcinoembrionario (CEA), EGFRvIII, el antígeno-125 del cáncer (CA-125), CA19-9, calretinina, MUC-1, proteína de membrana epitelial (EMA), antígeno tumoral epitelial (ETA), tirosinasa, antígeno asociado al melanoma (MAGE), CD19, CD20, CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína del líquido de la enfermedad quística macroscópica (GCDP-15), antígeno HMB-45, proteína melan-A (antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T; MART-1), myo-D1, actina específica de músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisis, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo-1, receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), la forma dimérica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (tumor M2-PK), una proteína ras anormal o una proteína p53 anormal.

En ciertas realizaciones, el TAA o TSA es un antígeno de cáncer/testículo (CT), por ejemplo, BAGE, CAGE, CTAGE, FATE, GAGE, HCA661, HOM-TES-85, MAGEA, MAGEB, MAGEC, NA88, NY-ESO-1, NY-SAR-35, OY-TES-1, SPANXB1, SPA17, SSX, SYCP1, o TPTE.

En ciertas realizaciones, el TAA o TSA es un carbohidrato o gangliósido, por ejemplo, fuc-GM1, GM2 (antígeno oncofetal-inmunogénico-1; OFA-I-1); GD2 (OFA-I-2), GM3, GD3, y similares.

En ciertas realizaciones, el TAA o TSA es alfa-actinina-4, Bage-1, BCR-ABL, proteína de fusión Bcr-Abl, beta-catenina, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29/BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, Casp-8, cdc27, cdk4, cdkn2a, CEA,

coa-1, proteína de fusión dek-can, EBNA, EF2, antígenos del virus de Epstein Barr, proteína de fusión ETV6-AML1, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAA0205, Mart2, Mum-1, 2, y 3, neo-PAP, miosina clase I, OS-9, proteína de fusión pml-RAR α , PTPRK, K-ras, N-ras, triosefosfato isomerasa, Gage 3,4,5,6,7, GnTV, Herv-K-mel, Lage-1, NA-88, NY-Eso-1/Lage-2, SP17, SSX-2, TRP2-Int2,, gp100 (Pmel 17), tirosinasa, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, RAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15(58), RAGE, SCP-1, Hom/Mel-40, PRAME, p53, H-Ras, HER-2/neu, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, antígenos E6 y E7 del virus del papiloma humano (VPH), TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, 13-Catenina, Mum-1, p16, TAGE, PSMA, CT7, telomerasa, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, 13HCG, BCA225, BTAA,, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NBV70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90, TAAL6, TAG72, TLP, TPS, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRvIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteína, TARP (proteína de marco de lectura alterna del receptor gamma de células T), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial de seis membranas de la próstata 1), una proteína ras anormal o una proteína p53 anormal. En otra realización específica, dicho antígeno asociado a tumor o antígeno específico de tumor es la integrina $\alpha\beta 3$ (CD61), galactina, K-Ras (oncogén viral de sarcoma de rata V-Ki-ras2 Kirsten), o Ral-B. Los expertos en la técnica conocen otros antígenos asociados a tumores y específicos de tumores.

Los anticuerpos y los scFvs que se unen a los TSA y los TAA incluyen anticuerpos y scFvs conocidos en la técnica, al igual que las secuencias de nucleótidos que los codifican.

En ciertas realizaciones específicas, el antígeno es un antígeno que no se considera un TSA o un TAA, pero que sin embargo está asociado a células tumorales, o a daños provocados por un tumor. En ciertas realizaciones, por ejemplo, el antígeno es, por ejemplo, un factor de crecimiento, citoquina o interleucina, por ejemplo, un factor de crecimiento, citoquina o interleucina asociado con la angiogénesis o vasculogénesis. Tales factores de crecimiento, citoquinas o interleucinas pueden incluir, por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) o la interleucina-8 (IL-8). Los tumores también pueden crear un entorno hipóxico local al tumor. Como tal, en otras realizaciones específicas, el antígeno es un factor asociado a la hipoxia, por ejemplo, HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α , HIF-2 β , HIF-3 α o HIF-3 β . Los tumores también pueden provocar daño localizado al tejido normal, provocando la liberación de moléculas conocidas como moléculas de patrón molecular asociado a daño (DAMPs; también conocidas como alarminas). En ciertas otras realizaciones específicas, por lo tanto, el antígeno es un DAMP, por ejemplo, una proteína de choque térmico, la proteína asociada a la cromatina de grupo de alta movilidad box 1 (HMGB1), S100A8 (MRP8, calgranulina A), S100A9 (MRP14, calgranulina B), amiloide sérico A (SAA), o puede ser un ácido desoxirribonucleico, trifosfato de adenosina, ácido úrico o sulfato de heparina.

En ciertas realizaciones de los polipéptidos descritos en la presente, el dominio extracelular se une a dicho dominio transmembrana directamente o mediante una secuencia de polipéptido conector, espaciador o bisagra, por ejemplo, una secuencia de CD28 o una secuencia de CTLA4.

5.3. Ácidos nucleicos aislados

Un experto en la técnica apreciará que los métodos descritos en la presente no se limitan a la transducción de ningún tipo particular de vector y que los vectores transducidos no están limitados con respecto al tipo particular de ácido nucleico que comprenden. Por consiguiente, debe entenderse que los vectores que comprenden ácidos nucleicos usados para transducir células de acuerdo con los métodos descritos en la presente pueden comprender, por ejemplo, cualquier ácido nucleico que codifique cualquier proteína o polipéptido de interés (por ejemplo, CARs).

En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos pueden estar contenidos en cualquier vector de polinucleótidos adecuado para la transducción de células inmunitarias, por ejemplo, linfocitos T. Por ejemplo, los linfocitos T pueden transformarse o transducirse usando vectores sintéticos, vectores retrovirales (por ejemplo, vectores lentivirales), plásmidos de replicación autónoma, un virus (por ejemplo, un retrovirus, lentivirus, adenovirus o herpesvirus), o similares, que contengan polinucleótidos que codifiquen polipéptidos de interés (por ejemplo, receptores quiméricos).

En una realización específica, se usan vectores retrovirales, por ejemplo vectores lentivirales, de acuerdo con los métodos descritos en la presente. Los vectores retrovirales, por ejemplo vectores lentivirales, adecuados para la transformación o transducción de linfocitos T incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, los vectores lentivirales descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 5.994.136; 6.165.782; 6.428.953; 7.083.981; y 7.250.299.

En otra realización específica, los vectores del VIH se usan de acuerdo con los métodos descritos en la presente. Los vectores de VIH adecuados para la transducción de linfocitos T incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, los vectores descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.665.571.

Los ácidos nucleicos útiles en la producción de polipéptidos, por ejemplo, en un linfocito T, incluyen ADN, ARN o análogos de ácidos nucleicos. Los análogos del ácido nucleico pueden modificarse en la fracción de base, la

fracción de azúcar o el estructura principal de fosfato, y pueden incluir la sustitución de la desoxiuridina por la desoxitimidina, la 5-metil-2'-desoxicitidina o la 5-bromo-2'-desoxicitidina por la desoxicitidina. Las modificaciones de la fracción de azúcar pueden incluir la modificación del hidroxilo 2' del azúcar ribosa para formar azúcares 2'-O-metilo o 2'-O-alilo. La estructura principal del fosfato de desoxirribosa puede modificarse para producir ácidos nucleicos morfolinos, en donde cada fracción de base está unida a un anillo morfolino de seis miembros, o ácidos nucleicos peptídicos, en donde la estructura principal del fosfato de desoxirribosa se sustituye por una estructura principal pseudopeptídica y se conservan las cuatro bases. Consultar, por ejemplo, Summerton y Weller (1997) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7:187-195; y Hyrup et al. (1996) Bioorgan. Med. Chain. 4:5-23. Además, la estructura principal de desoxifosfato puede sustituirse, por ejemplo, por una estructura principal de fosforotioato o fosforoditioato, una fosforoamidita o una estructura principal de fosfotriester alquilo.

6. EJEMPLOS

6.1. Ejemplo 1: Transducción de linfocitos T primarios con exposición concomitante a BX795

6.1.1. El tratamiento concurrente de linfocitos T humanos primarios con DEAE-Dextrano facilita la transducción lentiviral.

Se cultivaron linfocitos T humanos primarios en medio RPMI-1640 suplementado con un 10% (v/v) de suero bovino fetal, y se activaron con Dynabeads® anti-CD3/CD28 en una proporción Dynabead:linfocito T de 3:1. Después de 24 horas de activación, se añadieron 50U/ml de IL-2 al medio de cultivo, con o sin DEAE-Dextrano (DD). El lentivirus que codifica el vector JL28.2 (VEGFR2-CD28TM-CD28IC-P2A-GFP), que codifica un receptor de antígeno quimérico compuesto de VEGFR2 y proteína GFP, se añadió al cultivo de linfocitos T activados a una multiplicidad de infección (MOI) de 1,8. Se usó la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) para determinar la proporción de linfocitos T que expresaban VEGFR2 como marcador de células transducidas con éxito. Como se muestra en la Figura 1A, el 2,61% de las células tratadas con simulado (es decir, células que no recibieron virus) expresaban VEGFR2⁺, el 3,99% de las células incubadas con lentivirus pero sin DD expresaban VEGFR2⁺, mientras que el 9,80% de las células incubadas con lentivirus y DD expresaban VEGFR2⁺. Por tanto, se determinó que el tratamiento de linfocitos T humanos primarios con DEAE-dextrano facilita la transducción lentiviral.

6.1.2. El tratamiento concurrente con BX795 aumenta la eficacia de transducción de linfocitos T humanos primarios

Se cultivaron y activaron linfocitos T humanos primarios como en la Sección 6.1.1 y se transdujeron con el vector JL28.2 en presencia de DEAE-Dextrano (DD) y un intervalo de concentraciones de BX795, que se añadió concurrentemente con el lentivirus y se dejó incubar durante seis horas. A continuación, los linfocitos transducidos se analizaron mediante FACS para determinar la proporción de células transducidas con éxito. Como se muestra en la Figura 1B, hubo un aumento en la eficacia de la transducción viral que se correlacionó con el aumento de la concentración de BX795 (el 7,63% de las células transducidas fueron VEGFR2⁺ cuando se trataron con 1µM de BX795 y el 10,5% de las células transducidas fueron VEGFR2⁺ cuando se trataron con 10µM de BX795). Por tanto, se determinó que el tratamiento concurrente de linfocitos T con lentivirus y BX795 a dosis altas (10µM) resulta en una mayor eficacia de transducción de las células por vectores lentivirales.

6.2. Ejemplo 2: El pretratamiento con BX795 es necesario para aumentar la eficacia de transducción de linfocitos T humanos primarios.

Se cultivaron y activaron linfocitos T humanos primarios como se describe en el Ejemplo 1, pero con una población celular tratada sólo con DD ("Control sólo DD"), una población celular tratada con BX795 6µM añadido concurrentemente con la transducción lentiviral durante un periodo de seis horas ("Concurrente"), una población celular tratada con BX795 6µM durante tres horas antes de la transducción lentiviral ("Pretratada") y una población celular tratada con BX795 6µM antes y concurrentemente con la transducción lentiviral durante un periodo total de nueve horas ("Pretratada+Concurrente").

Los linfocitos T se cultivaron durante ocho días después de la transducción, y la expresión de VEGFR2 se monitorizó en los días 3 y 8 posteriores a la transducción. Como se muestra en la Figura 2, la adición de BX795 a los cultivos de linfocitos T junto con el lentivirus no mostró ninguna mejora en la expresión de VEGFR2 ni en el día 3 ni en el día 8 en comparación con los cultivos de control sólo DD. El pretratamiento de linfocitos T con BX795 produjo un aumento de la expresión de VEGFR2 tanto en el día 3 como en el día 8 en comparación con los cultivos de control sólo DD. Los cultivos de linfocitos T tratados con BX795 tanto antes como durante la transducción lentiviral expresaron VEGFR2 a un nivel aproximadamente dos veces superior al de los cultivos sólo DD y superior al de cualquiera de los otros dos linfocitos tratados con BX795 (9,80% de las células eran VEGFR2⁺ en el Control sólo DD en el día 3 en comparación con el 18,4% de células VEGFR2⁺ en el grupo Pretratado+Concurrente en el día 3; y el 4,95% de las células eran VEGFR2⁺ en el Control Sólo DD en el día 8 en comparación con el 10,6% de células VEGFR2⁺ en el grupo Pretratado+Concurrente).

6.3. Ejemplo 3: Tratamiento de linfocitos T humanos primarios con 2-Aminopurina

6.3.1. La 2-aminopurina no altera la viabilidad celular

Se cultivaron linfocitos T humanos primarios en medio RPMI-1640 suplementado con un 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS), y se activaron con Dynabeads® anti-CD3/CD28 a una proporción Dynabead:linfocito T de 3:1 durante 24 horas. Se añadió 2-aminopurina (2-AP) a los cultivos y se incubaron durante 90 minutos a 37C. Se añadió DEAE-dextrano (DD) o sulfato de protamina (PS) a los cultivos en presencia de 50U/ml de IL-2 y vector lentiviral JL28.2 a una MOI de 3. Se analizó la viabilidad de las células mediante FACS.

En ausencia de 2-AP, el 84% de las células tratadas sin DD ni PS eran viables tras la transducción lentiviral, mientras que el 73,6% de las células eran viables cuando se transducían en presencia de DD, y el 84,9% de las células eran viables cuando se transducían en presencia de PS. (Figura 3A) Cuando los linfocitos T primarios se cultivaron como se ha indicado anteriormente con la adición de 2-AP a 2,5mM, 5mM o 10mM, la viabilidad no se redujo en comparación con las células cultivadas en ausencia de 2-AP (Figura 3B), lo que indica que el 2-AP no altera la viabilidad de los linfocitos T humanos primarios activados en cultivo.

6.3.2. El tratamiento con 2-Aminopurina mejora la eficacia de la transducción lentiviral de linfocitos T humanos primarios.

Se cultivaron linfocitos T humanos primarios como en la Sección 6.3.1 y se analizaron por FACS para determinar la expresión de VEGFR2. Como se muestra en la Figura 4A, el 4,49% de las células transducidas con lentivirus en ausencia de DD o PS fueron positivas para VEGFR2, mientras que el 1,25% de las células tratadas sólo con DD fueron VEGFR2⁺ y el 0,565% de las células tratadas sólo con PS fueron VEGFR2⁺.

En presencia de DD o PS, la transducción lentiviral aumentó cuando los linfocitos T primarios se pretrataron con 2-AP durante 90 minutos y se mantuvieron en cultivo con lentivirus y varias concentraciones de 2-AP durante 5 horas (Figura 4B). Todas las concentraciones de 2-AP (es decir, 2,5mM, 5mM o 10mM) aumentaron la eficacia de la transducción en comparación con las células no expuestas a 2-AP (Control). Estos resultados indican que el tratamiento con 2-AP aumenta la eficacia de transducción de linfocitos T humanos primarios en presencia de DEAE-dextrano o sulfato de protamina.

EQUIVALENTES

El alcance de la presente divulgación no debe limitarse a las realizaciones específicas descritas en la presente. De hecho, varias modificaciones de la materia proporcionada en la presente, además de los descritos, se harán evidente para los expertos en la técnica de la descripción anterior. Se pretende que tales modificaciones estén incluidas en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método de transducción de un linfocito T primario, que comprende:

- 5 (i) poner en contacto un linfocito T primario con un compuesto que sea BX795 o 2-Aminopurina;
- (ii) poner en contacto dicho linfocito T primario con un vector lentiviral o retroviral que comprende un ácido nucleico, en donde dicho ácido nucleico codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio extracelular,
- 10 en donde dicho contacto de dicho linfocito T primario con dicho compuesto se produce antes del contacto de dicho linfocito T primario con dicho vector lentiviral o vector retroviral; y
- en donde dicho método comprende además poner en contacto dicho linfocito T primario con un agente capaz de estimular un complejo receptor de células T antes de poner en contacto dicho linfocito T primario con dicho vector lentiviral o vector retroviral;
- 15 en donde dicho agente es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 y/o CD28; y
- mediante el cual el ácido nucleico se transduce en el linfocito T.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el dominio extracelular de dicho CAR se une a un antígeno que se expresa en una célula de un linfoma, un cáncer de pulmón, un cáncer de mama, un cáncer de próstata, un carcinoma adrenocortical, un carcinoma tiroideo, un carcinoma nasofaríngeo, un melanoma, un melanoma maligno, un carcinoma cutáneo, un carcinoma colorrectal, un tumor desmoide, un tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, un tumor endocrino, un sarcoma de Ewing, un tumor neuroectodérmico primitivo periférico, un tumor sólido de células germinales, un hepatoblastoma, un neuroblastoma, un sarcoma de partes blandas no rhabdomyosarcoma, un osteosarcoma, un retinoblastoma, un rhabdomyosarcoma, un tumor de Wilms, un glioblastoma, un mixoma, un fibroma,

25 un lipoma, una leucemia linfocítica crónica (linfoma linfocítico pequeño), una leucemia prolinfocítica de células B, un linfoma linfoplasmocítico, una macroglobulinemia de Waldenström, un linfoma de la zona marginal esplénica, un mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma, linfoma extraganglionar de células B de la zona marginal, linfoma 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 primaria, linfoma de Burkitt, leucemia prolinfocítica de linfocitos T, leucemia linfocítica granular de linfocitos T, leucemia agresiva de células NK, leucemia/linfoma de linfocitos T del adulto, linfoma extraganglionar de linfocitos NK/T, tipo nasal, linfoma de linfocitos T tipo enteropatía, linfoma de linfocitos T hepatoesplénico, linfoma blástico de células NK, micosis fungoide, síndrome de Sezary, linfoma anaplásico primario cutáneo de células grandes, papulosis linfomatoide, linfoma angioinmunoblástico de linfocitos T, linfoma periférico de linfocitos T (no especificado), linfoma anaplásico de células grandes, linfoma de Hodgkin o linfoma no Hodgkin.

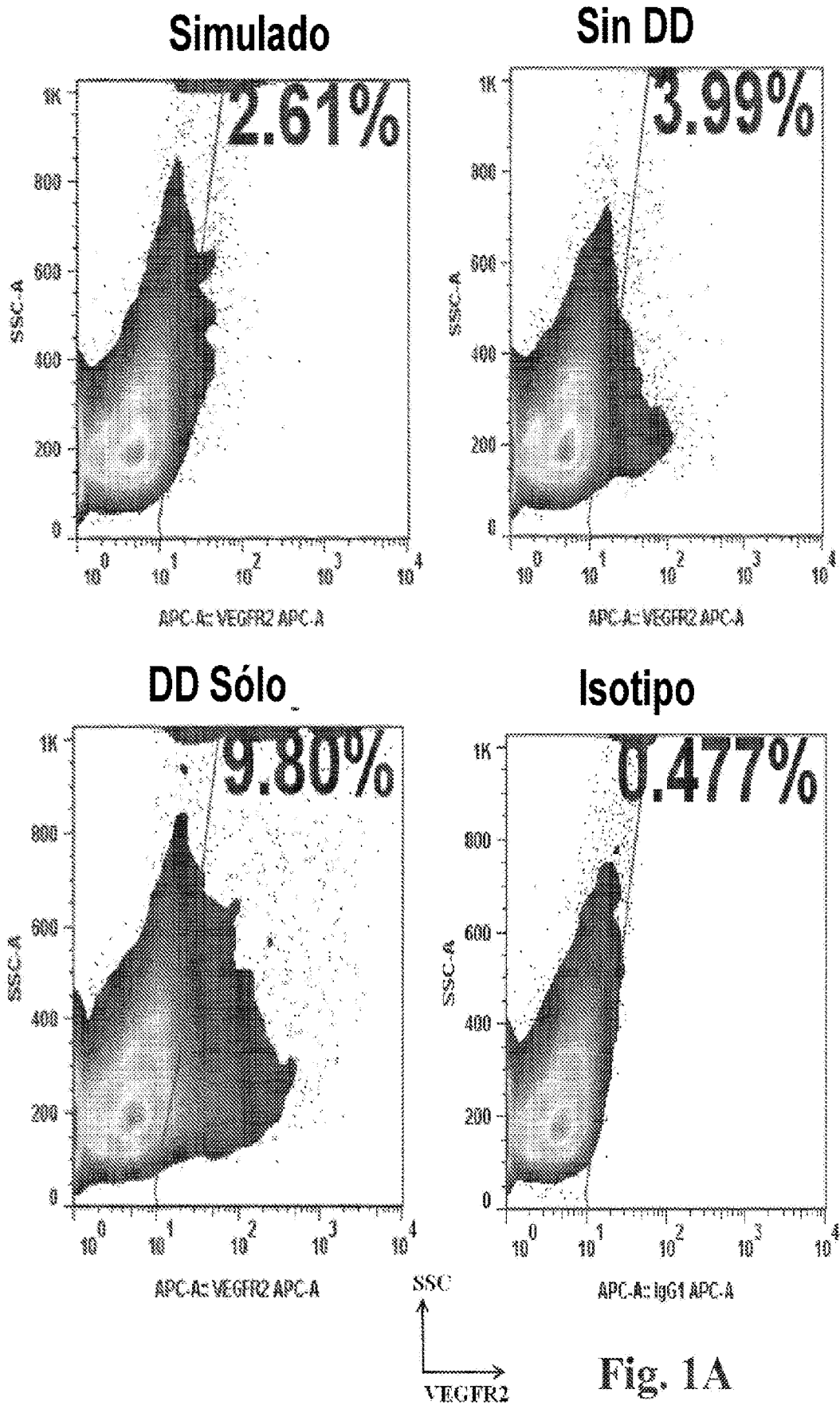
3. El método de la reivindicación 2, en donde dicho antígeno que se expresa en una célula es alfa-actinina-4, Bage-1, BCMA, BCR-ABL, proteína de fusión Bcr-Abl, beta-catenina, CA 125, CA 15-3, CA 27.29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, Casp-8, cdc27, cdk4, cdkn2a, CEA, coa-1, proteína de fusión dek-can, EBNA, EF2, antígenos del virus de Epstein Barr, proteína de fusión ETV6-AML1, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAA0205, Mart2, Mum-1, Mum-2, Mum-3, neo-PAP, miosina clase I, PSCA, PSMA, OS-9, proteína de fusión pml-RAR α , PTPRK, K-ras, N-ras, trifosfato isomerasa, Gage 3,4,5,6,7, GnTV, Herv-K-mel, Lage-1, NA-88, NY-Eso-I/Lage-2, SP17, SSX-2, TRP2-Int2, gp100, Pmel 17, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, RAGE, GAGE-1, GAGE-2, pl5(58), RAGE, SCP-1, Hom/Mel-40, PRAME, p53, H-Ras, HER-2/neu, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, antígeno E6 del virus del papiloma humano, antígeno E7 del virus del papiloma humano, TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, pl85erbB2, pl80erbB-3, c-met, nm-23HI, PSA, TAG-72-4, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, 13-Catenina, Mum-1, pl6, TAGE, PSMA, CT7, telomerasa, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, 13HCG, BCA225, BTAA, CD68KP1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733, EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NBV70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90, TAAL6, TAG72, TLP, TPS, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2, EGFRvIII, proteína espermática 17, mesotelina, PAP, proteína, TARP, Trp-p8, STEAP1, una proteína ras anormal, una proteína p53 anormal, integrina $\alpha\beta$ 3 (CD61), galactina, K-Ras (oncogén viral del sarcoma de rata de V-Ki-ras2 Kirsten), Ral-B, Her2, alfa-fetoproteína, antígeno carcinoembrionario, EGFRvIII, antígeno del cáncer-125, CA19-9, calretinina, MUC-1, proteína de la membrana epitelial, antígeno del tumor epitelial, tirosinasa, antígeno asociado al melanoma, CD19, CD20, CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial, proteína del líquido de la enfermedad quística macroscópica,

45 antígeno HMB-45, proteína melan-A, MART-1, mio-DI, actina específica del músculo, neurofilamento, enolasa específica de la neurona, fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisis, tiroglobulina, factor 1 de transcripción tiroideo, receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, o la forma dimérica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho linfocito T primario es un linfocito T primario humano.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho contacto de dicho linfocito T primario con dicho compuesto se produce tres horas antes de dicho contacto de dicho linfocito T primario con dicho vector lentiviral o vector retroviral.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho vector lentiviral o vector retroviral entra en contacto con dicho linfocito T primario a una multiplicidad de infección (MOI) de 1,5 a 2,5.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho ácido nucleico:
- (i) tiene una longitud de más de 10 kilobases (kb); y/o
 - (ii) tiene aproximadamente entre 9 y 20 kb de longitud.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho BX795 está a una concentración de 4-8 μ M.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha 2-Aminopurina está a una concentración de 2,5-10 mM.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho agente entra en contacto con dicho linfocito T primario durante 24 horas antes del contacto de dicho linfocito T primario con dicho vector lentiviral o vector retroviral.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, comprende además poner en contacto dicho linfocito T primario con dicho compuesto concurrentemente con y/o después de dicho contacto con dicho vector lentiviral o vector retroviral.
12. El método de la reivindicación 11, que comprende poner en contacto dicho linfocito T primario con dicho vector lentiviral o vector retroviral y dicho compuesto concurrentemente durante por lo menos seis horas.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además poner en contacto dicho linfocito T primario con un reactivo de transformación y una citoquina.
14. El método de la reivindicación 13, en el que
- (i) dicho reactivo de transformación es dietilaminoetil-dextrano o sulfato de protamina, y/o
 - (ii) dicha citoquina es la interleucina 2 (IL-2).
15. El método de la reivindicación 14, que comprende poner en contacto dicho linfocito T primario, en donde dicho linfocito T primario es un linfocito T primario humano, en presencia de dietilaminoetil-dextrano o sulfato de protamina e interleucina 2 (IL-2), con
- (i) dicho BX795, y
 - (ii) dicho vector lentiviral o vector retroviral que comprende dicho ácido nucleico, y mediante el cual dicho ácido nucleico se transduce en dicho linfocito T primario humano; en el que dicho BX795 está a una concentración de 6 μ M; y
- en el que dicho contacto de dicho linfocito T primario humano con dicho BX795 se produce durante tres horas, seguido de por lo menos seis horas de contacto concurrente de dicho linfocito T primario humano con dicho vector lentiviral o vector retroviral y dicho BX795.
16. El método de la reivindicación 14, que comprende poner en contacto dicho linfocito T primario, en el que dicho linfocito T primario es un linfocito T primario humano, en presencia de dietilaminoetil-dextrano o sulfato de protamina e interleucina 2 (IL-2), con
- (i) dicha 2-Aminopurina, y
 - (ii) dicho vector lentiviral o vector retroviral que comprende dicho ácido nucleico, y mediante el cual dicho ácido nucleico se transduce en dicho linfocito T primario humano, en el que dicha 2-Aminopurina está a una concentración de 2,5-10 mM; y
- en el que dicho contacto de dicho linfocito T primario humano con dicha 2-Aminopurina se produce durante 90 minutos, seguido de por lo menos cinco horas de contacto concurrente de dicho linfocito T primario humano con dicho vector lentiviral o vector retroviral y dicha 2-Aminopurina.



DEAE-Dextrano + BX795 (μM)

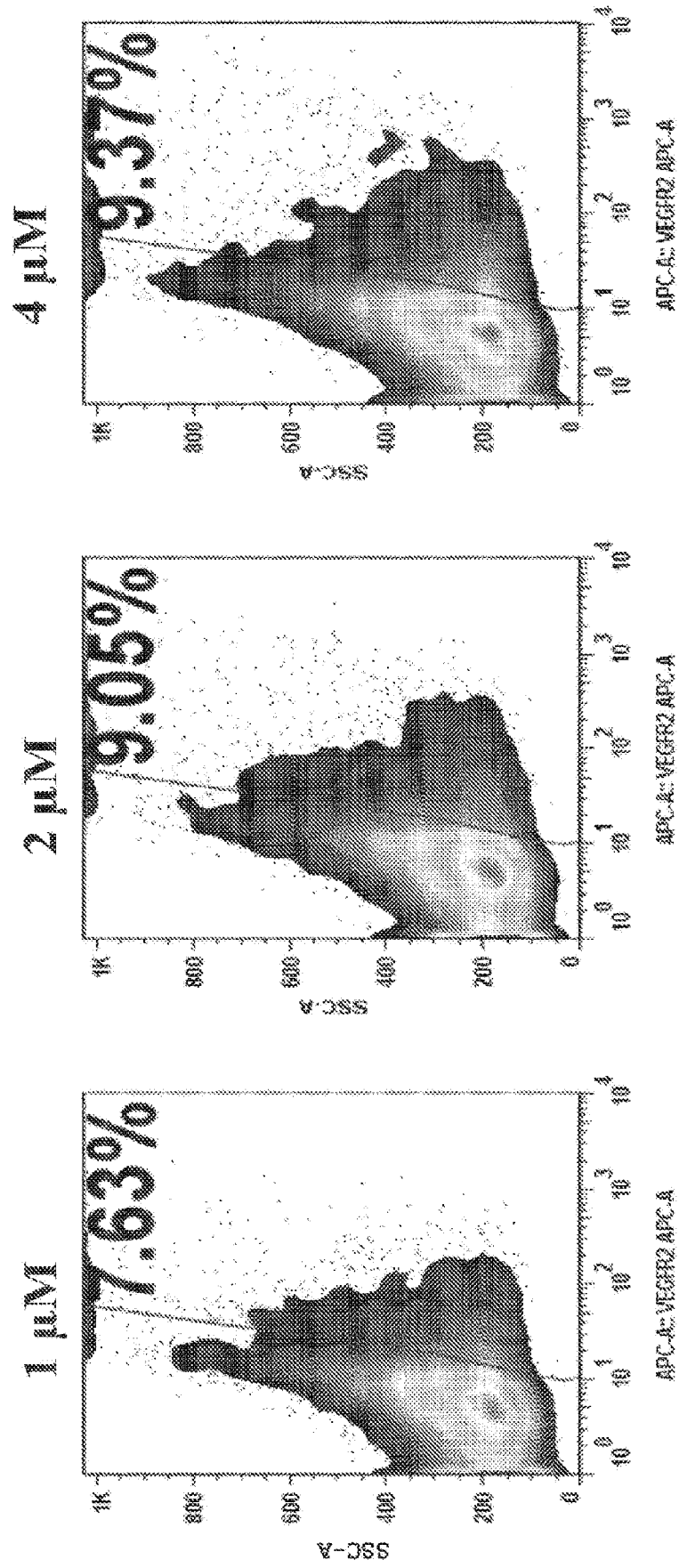


Fig. 1B -1

DEAE-Dextrano + BX795 (μM)

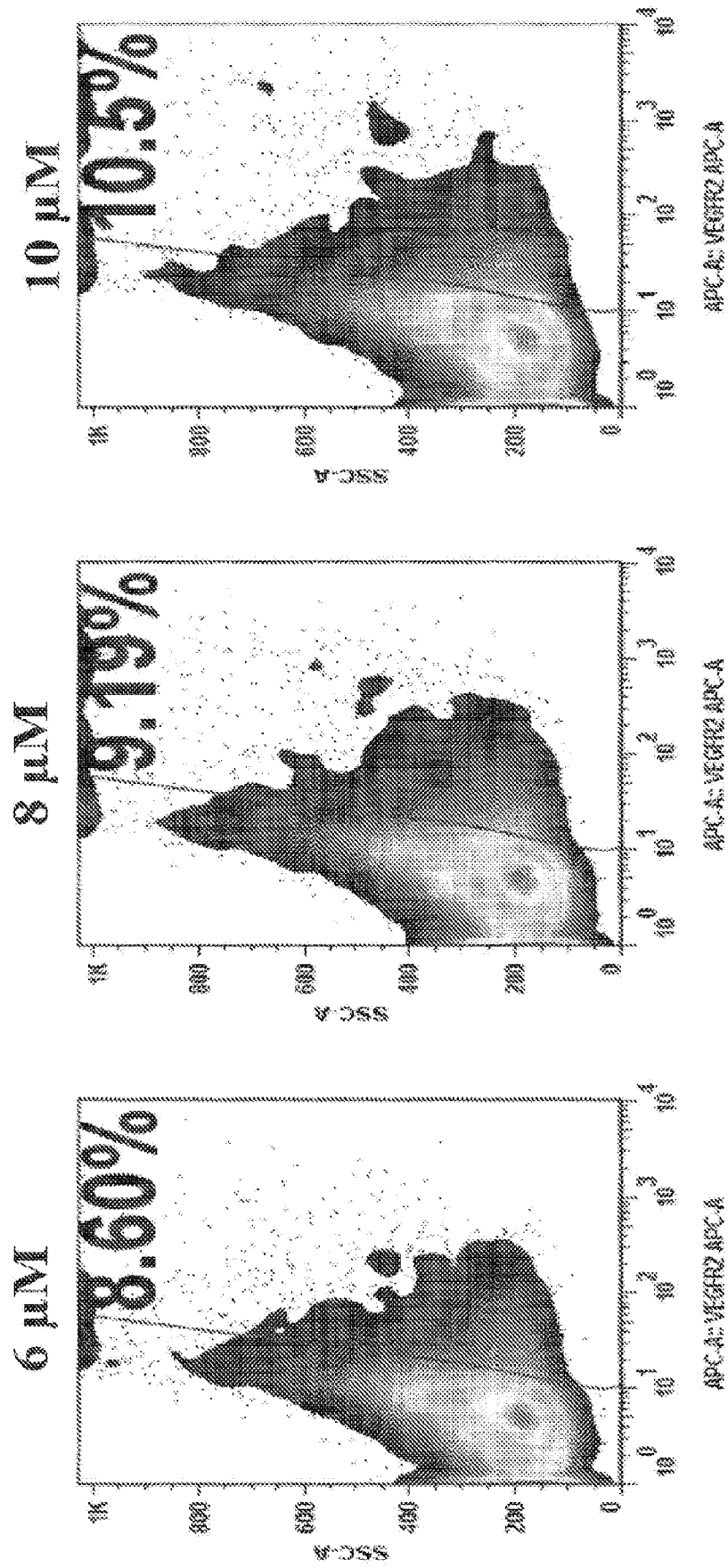
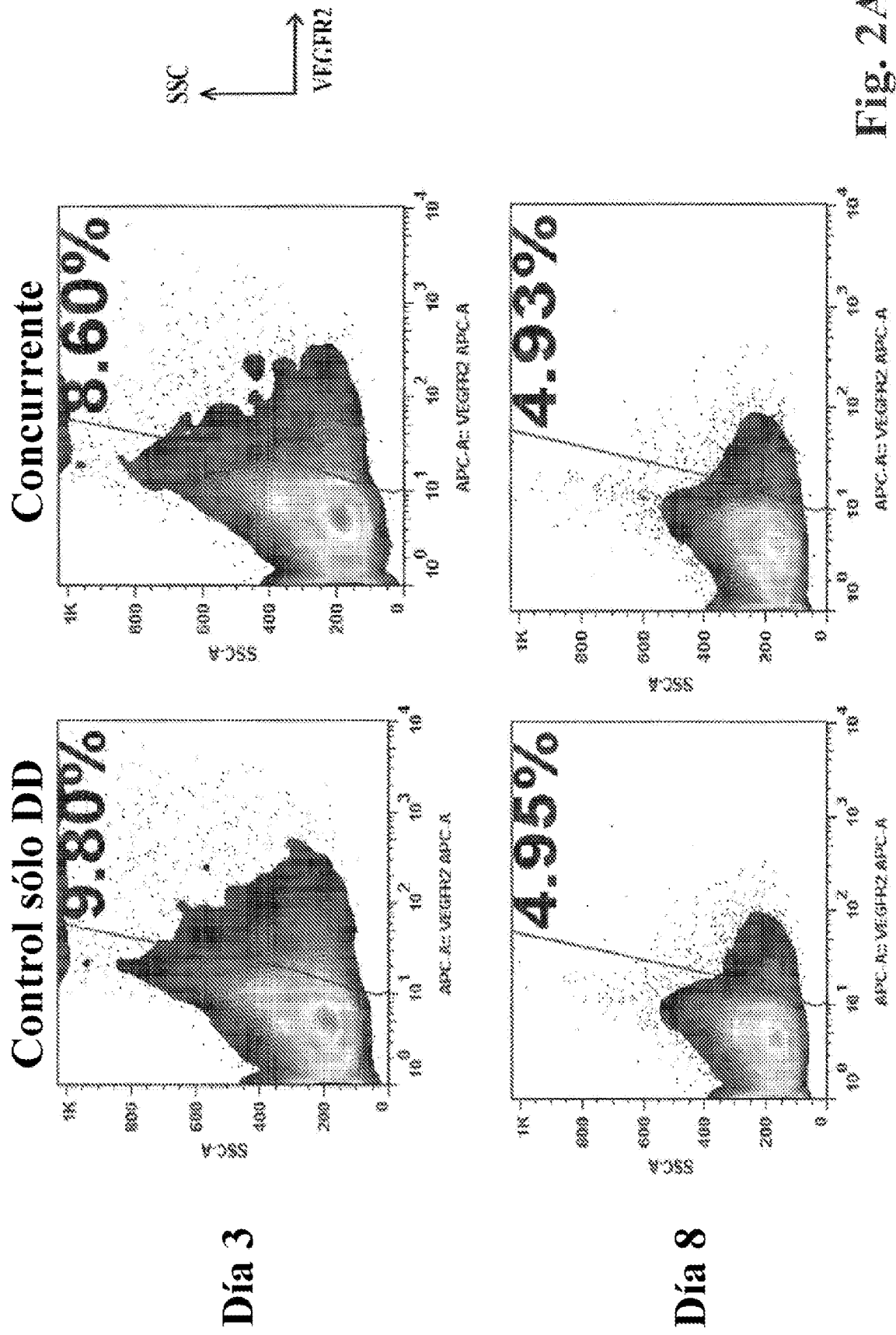
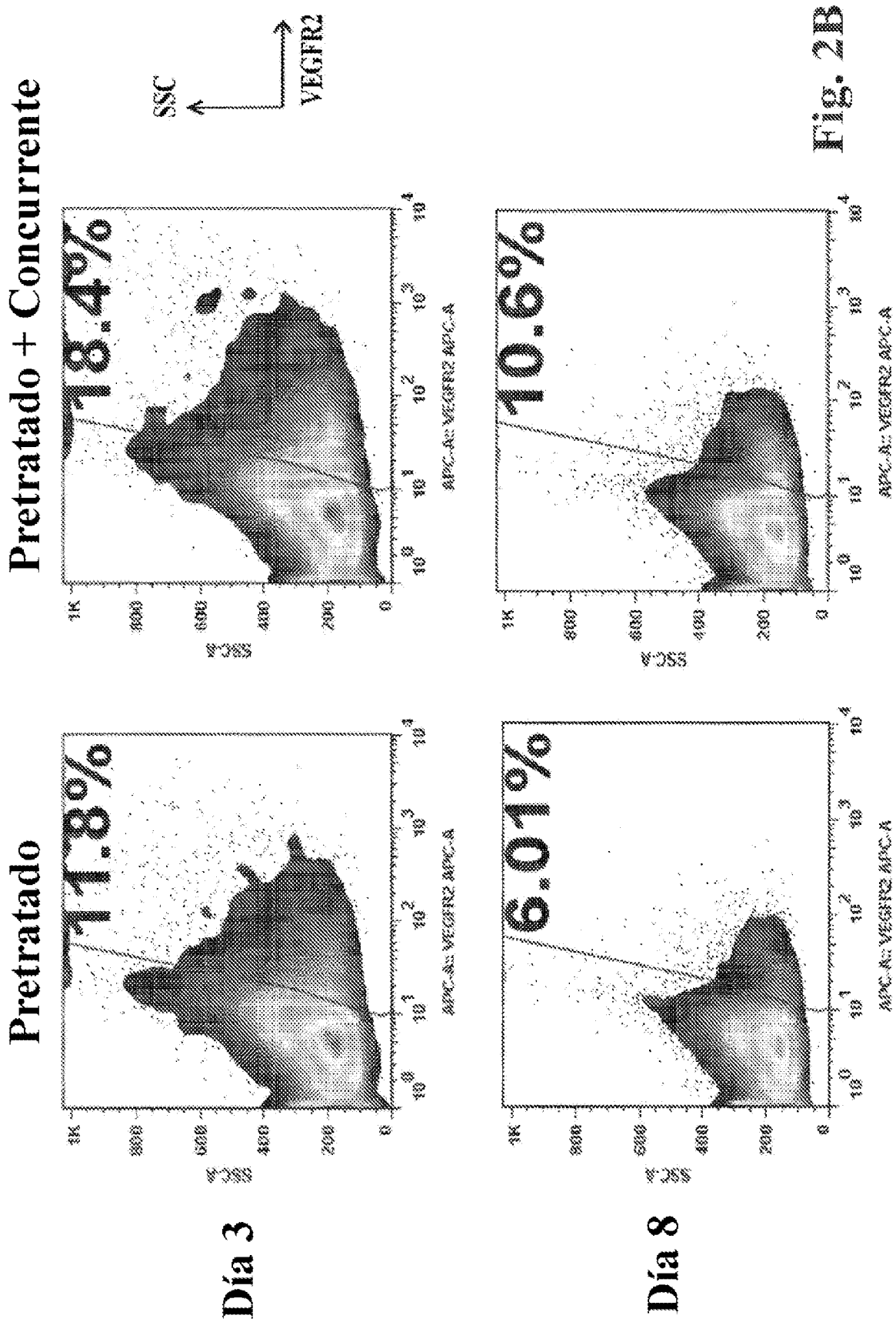
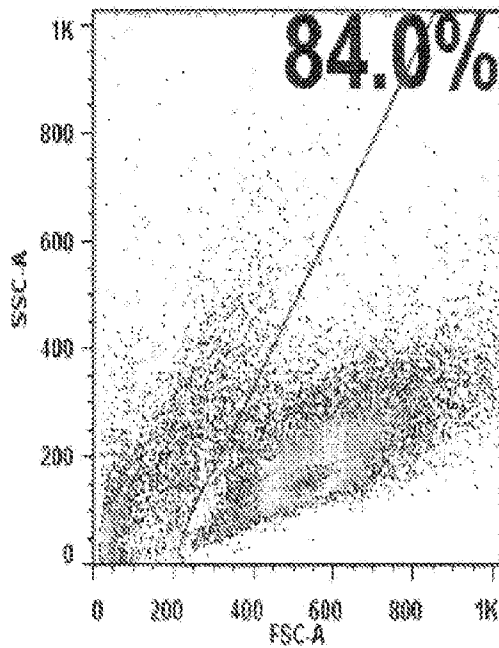


Fig. 1B -2

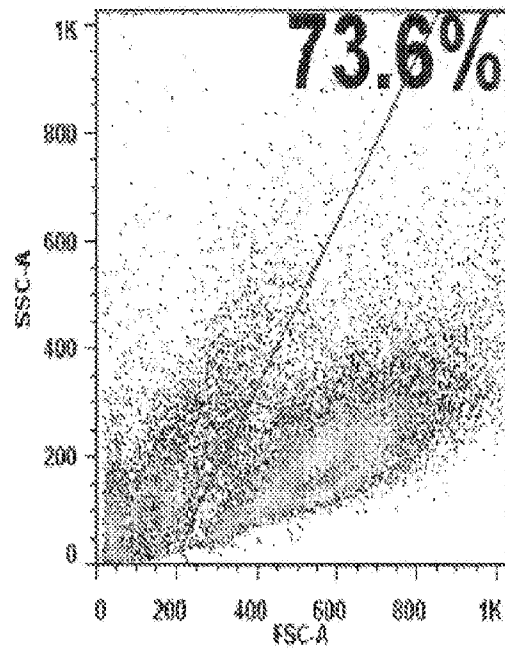




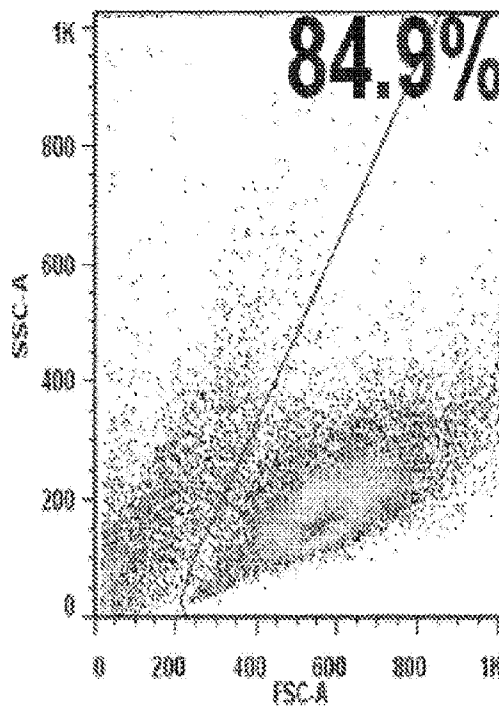
Sin policación



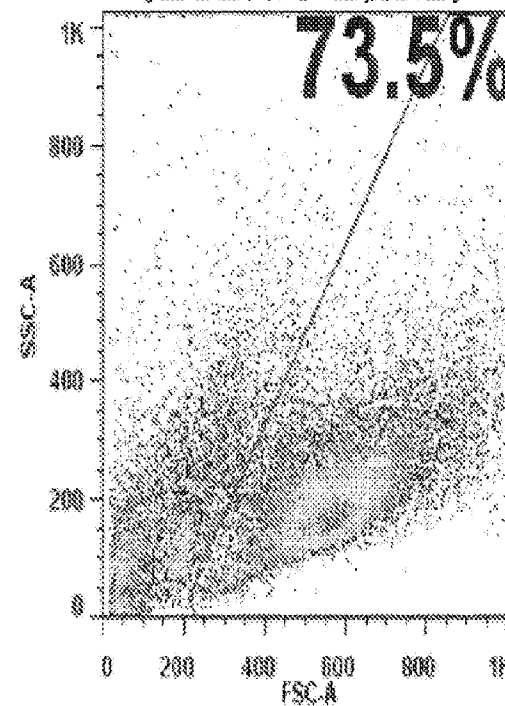
Simulado (DD)



Simulado (PS)



**Isotipo
(BX795 2 μ M)**



SSC
↑
FSC →

Fig. 3A

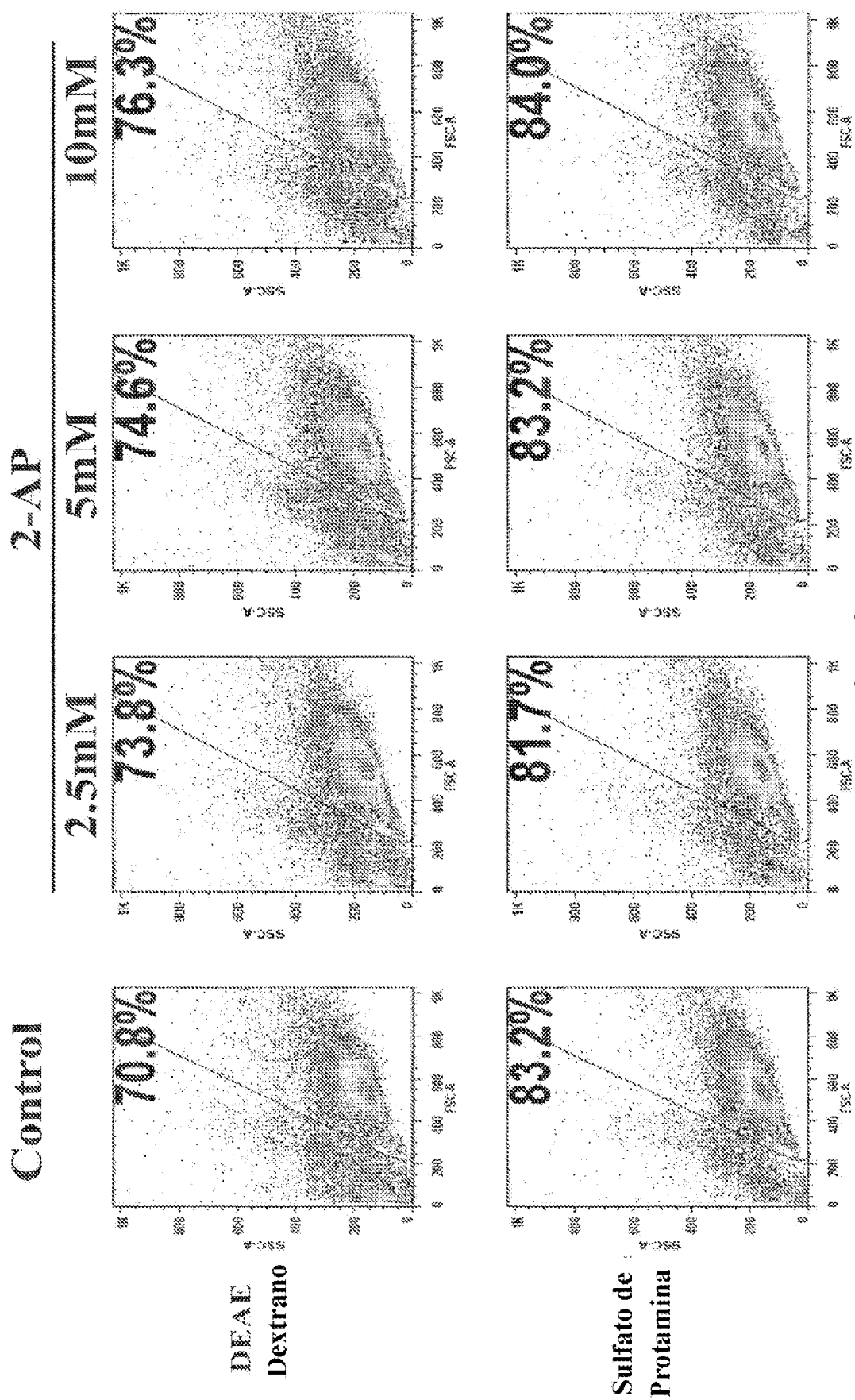


Fig. 3B

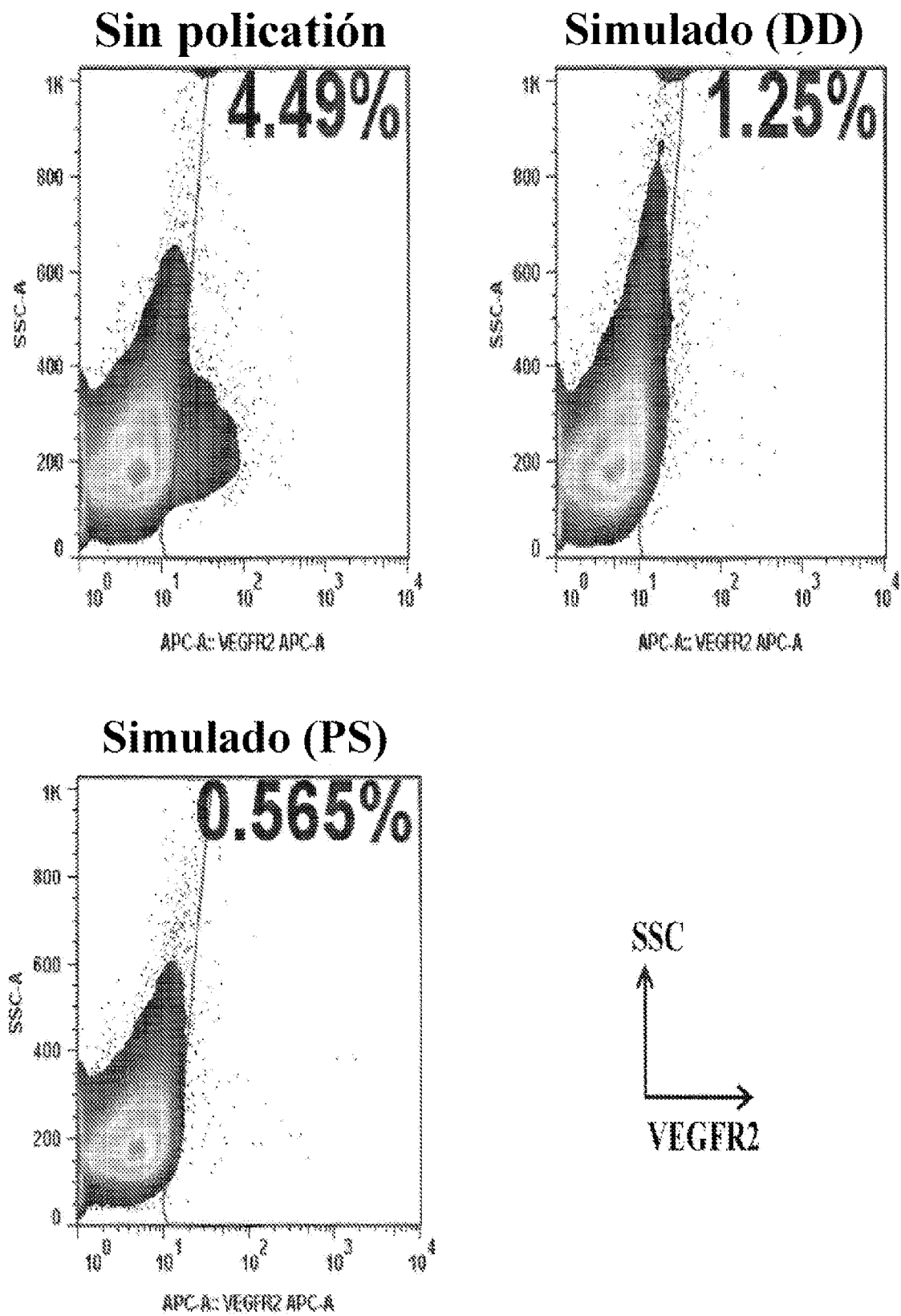


Fig. 4A

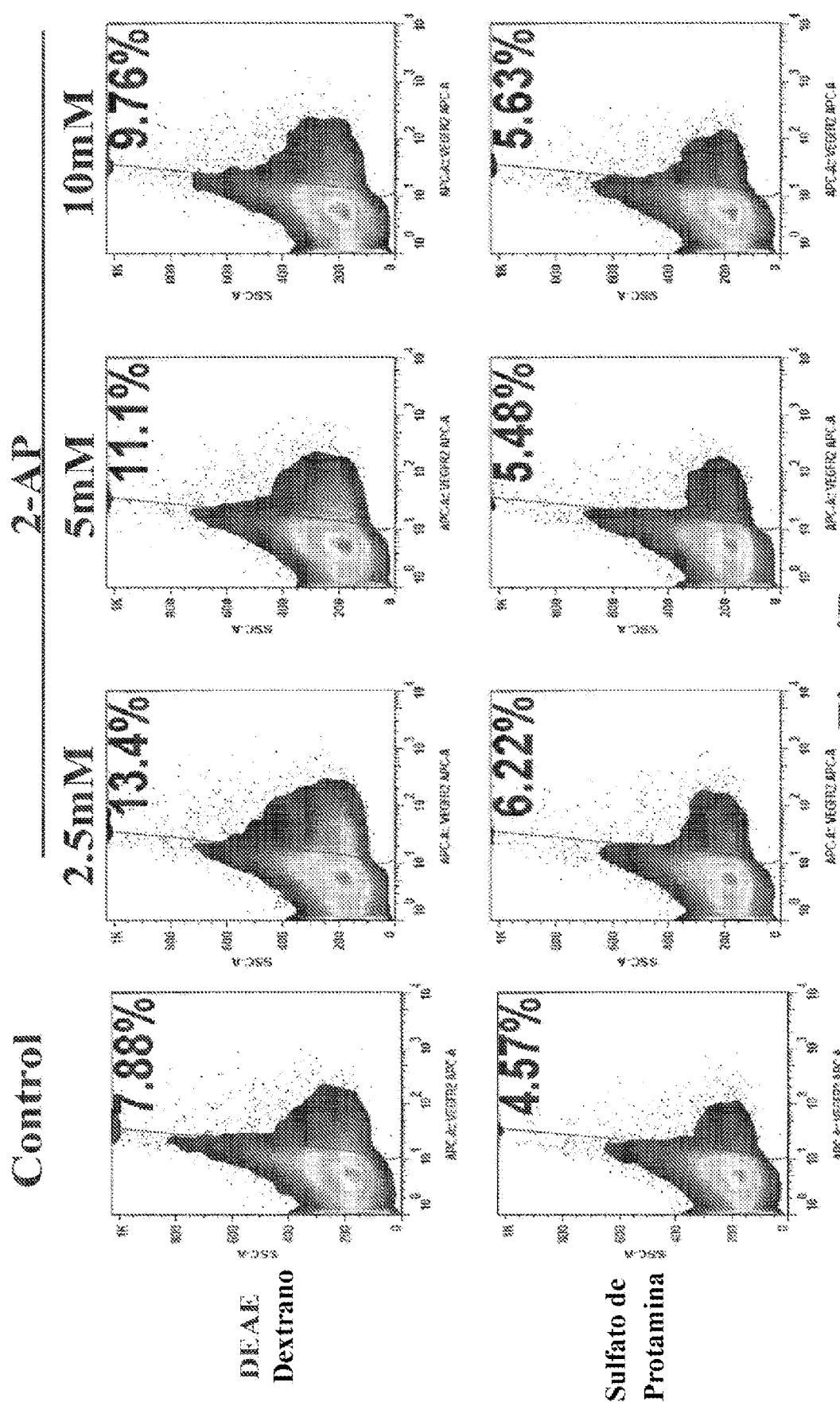


Fig. 4B