

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 609**

51 Int. Cl.:

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2020 PCT/EP2020/052965**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2020 WO20161224**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2020 E 20702490 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024 EP 3920960**

54 Título: **Tratamiento que implica células T y citoquinas diseñadas por CAR**

30 Prioridad:

08.02.2019 WO PCT/EP2019/053144

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.10.2024

73 Titular/es:

**BIONTECH CELL & GENE THERAPIES GMBH
(100.0%)
An der Goldgrube 12
55131 Mainz, DE**

72 Inventor/es:

**SAHIN, UGUR;
OEHM, PETRA;
RENGSTL, BENJAMIN y
REINHARD, KATHARINA**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 984 609 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

Tratamiento que implica células T y citoquinas diseñadas por CAR

La presente divulgación se refiere a métodos y agentes para mejorar el efecto de las células T diseñadas para expresar receptores de antígenos quiméricos (CAR). Estos métodos y agentes son, en particular, útiles para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por células enfermas que expresan un antígeno al que está dirigido el CAR. Específicamente, la presente divulgación se refiere a métodos que comprenden proporcionar a un sujeto células T genéticamente modificadas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) y administrar al sujeto IL2 o un polinucleótido que codifica IL2. Los métodos de la divulgación pueden comprender administrar IL2 o un polinucleótido que codifica IL2 y una citoquina adicional o un polinucleótido que codifica una citoquina adicional, en el que la citoquina adicional puede ser IL7 o IL21. Las células T genéticamente modificadas para expresar un CAR se pueden proporcionar al sujeto administrando las células T genéticamente modificadas para expresar un CAR o generando las células T genéticamente modificadas para expresar un CAR en el sujeto. Los métodos de la divulgación pueden comprender además administrar al sujeto un antígeno o una variante del mismo, o un polinucleótido que codifica un antígeno o una variante del mismo, en el que las células T genéticamente modificadas para expresar un CAR están dirigidas al antígeno. En una realización particularmente preferida, los polinucleótidos administrados de acuerdo con la presente divulgación son ARN.

Antecedentes

El sistema inmunitario desempeña una función importante en el cáncer, la autoinmunidad, las alergias y en las enfermedades asociadas a patógenos. Las células T desempeñan una función central en la inmunidad mediada por células en humanos y animales. El reconocimiento y la unión de un antígeno particular por parte de las células T está mediado por los receptores de células T (TCR) expresados en la superficie de las células T. El TCR de una célula T puede interactuar con péptidos inmunogénicos (epítomos) unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y presentados en la superficie de las células diana. La unión específica del TCR desencadena una cascada de señales dentro de la célula T que conduce a la proliferación y diferenciación en una célula T efectora madura.

La diversidad de los TCR se obtiene mediante el reordenamiento genético de diferentes segmentos discontinuos de genes que codifican las diferentes regiones estructurales de los TCR. Los TCR están compuestos por una cadena α y una cadena β o por una cadena γ y una cadena δ . Las cadenas α/β de TCR están compuestas por una región variable terminal N altamente polimórfica involucrada en el reconocimiento de antígenos y una región constante invariante. A nivel genético, estas cadenas están separadas en varias regiones, una región variable (V), una región de diversidad (D) (solo cadenas β y δ), una región de unión (J) y una región constante (C). Durante la diferenciación de las células T, se crean genes receptores de células T específicos reordenando un gen de la región V, una D (solo las cadenas β y δ), una J y una C. La diversidad de los TCR se amplifica aún más mediante un reordenamiento V-(D)-J impreciso en el que se introducen y/o eliminan nucleótidos aleatorios en los sitios de recombinación. Dado que la reordenación de los loci del gen TCR se produce en el genoma durante la maduración de las células T, cada célula T madura sólo expresa un TCR α/β o TCR γ/δ específico. El TCR es parte de una compleja maquinaria de señalización, que incluye el complejo heterodimérico de las cadenas α y β del TCR, el correceptor CD4 o CD8 y el módulo de transducción de señales CD3. Mientras que las cadenas CD3 transfieren la señal de activación al interior de la célula, el heterodímero α/β del TCR es el único responsable del reconocimiento del antígeno.

La inmunoterapia basada en la transferencia de células adoptivas (ACT) se puede definir en términos generales como una forma de inmunización pasiva con células T previamente sensibilizadas que se transfieren a receptores no inmunes o al huésped autólogo después de expansión *ex vivo* desde bajas frecuencias de precursores hasta números de células clínicamente relevantes. Los tipos de células que se han utilizado para los experimentos ACT son linfocitos citotóxicos activados por linfocinas (LAK) (Mule, JJ et al. (1984) Science 225, 1487-1489; Rosenberg, SA et al. (1985) N. Engl. J. Med. 313, 1485-1492), linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) (Rosenberg, SA et al. (1994) J. Natl. Cancer Inst. 86, 1159-1166), linfocitos de donantes después de un trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT), así como estirpes o clones de células T específicas de tumores (Dudley, ME et al. (2001) J. Immunother. 24, 363-373; Yee, C. et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 99, 16168-16173). Se demostró que la transferencia adoptiva de células T tiene actividad terapéutica contra infecciones virales humanas como el CMV. Si bien la infección por CMV y la reactivación de virus endógenos latentes están controladas por el sistema inmunitario en individuos sanos, produce una morbilidad y mortalidad significativas en individuos inmunocomprometidos, como los receptores de trasplantes o los pacientes con SIDA. Riddell y sus colaboradores demostraron la reconstitución de la inmunidad viral mediante la terapia adoptiva con células T en pacientes inmunodeprimidos después de la transferencia de clones de células T CD8+ específicas para CMV derivados de donantes de trasplante seropositivos para CMV compatibles con HLA (Riddell, SR (1992) Science 257, 238-241). Como enfoque alternativo, se transfirieron poblaciones de células T específicas de CMV o EBV derivadas de donantes policlonales a receptores de trasplantes, lo que resultó en una mayor persistencia de las células T transferidas (Rooney, CM et al. (1998) Blood 92, 1549-1555; Peggs, KS et al. (2003) Lancet 362, 1375-1377). Para la inmunoterapia adoptiva del melanoma, Rosenberg et al. establecieron un enfoque ACT basado en la infusión de *in vitro* linfocitos infiltrantes de tumores (TIL)

autólogos expandidos aislados de tumores extirpados en combinación con una quimioterapia linfodeplectora no mieloablativa y altas dosis de IL2. Un estudio clínico publicado recientemente dio como resultado una tasa de respuesta objetiva del -50 % de los pacientes tratados que padecían melanoma metastásico (Dudley, ME et al. (2005) J. Clin. Oncol. 23: 2346-2357).

- 5 Un enfoque alternativo es la transferencia adoptiva de células T autólogas reprogramadas para expresar un inmunorreceptor reactivo al tumor de especificidad definida durante un cultivo *ex vivo* de corta duración, seguido de reinfusión en el paciente (Kershaw MH et al. (2013) Nature Reviews Cancer 13 (8): 525-41). Esta estrategia hace que ACT sea aplicable a una variedad de neoplasias malignas comunes incluso si las células T reactivas al tumor están ausentes en el paciente. Dado que la especificidad antigénica de las células T depende
10 completamente del complejo heterodimérico de las cadenas α y β de TCR, la transferencia de genes de TCR clonados a células T ofrece la posibilidad de redirigirlos hacia cualquier antígeno de interés. Por lo tanto, la terapia génica TCR proporciona una estrategia atractiva para desarrollar inmunoterapia específica de antígeno con linfocitos autólogos como opción de tratamiento. Las principales ventajas de la transferencia de genes TCR son la creación de cantidades terapéuticas de células T específicas de antígeno en unos pocos días y la
15 posibilidad de introducir especificidades que no están presentes en el repertorio endógeno de TCR del paciente.

- Varios grupos demostraron que la transferencia del gen TCR es una estrategia atractiva para redirigir la especificidad antigénica de las células T primarias (Morgan, RA et al. (2003) J. Immunol. 171, 3287-3295; Cooper, L.J. et al. (2000) J. Virol. 74, 8207-8212; Fujio, K. et al. (2000) J. Immunol. 165, 528-532; Kessels, H.W. et al. (2001) Nat. Immunol. 2, 957-961; Dembic, Z. et al. (1986) Nature 320, 232-238). La viabilidad de la terapia
20 génica TCR en humanos fue demostrada inicialmente en ensayos clínicos para el tratamiento del melanoma maligno realizados por Rosenberg y su grupo. La transferencia adoptiva de linfocitos autólogos transducidos retroviralmente con TCR específicos de antígeno de melanoma/melanocitos dio como resultado la regresión del cáncer en hasta el 30 % de los pacientes con melanoma tratados. Morgan, R.A. et al. (2006) Science 314, 126-129; Johnson, L.A. et al. (2009) Blood 114, 535-546). Mientras tanto, las pruebas clínicas de la terapia génica TCR se extendieron también a otros cánceres distintos del melanoma, dirigidos a muchos antígenos tumorales diferentes (Park, TS et al., (2011) Trends Biotechnol. 29, 550-557).

- El uso de enfoques de ingeniería genética para insertar receptores dirigidos a antígenos de especificidad definida en las células T ha ampliado enormemente las capacidades potenciales de ACT. Los receptores de antígenos quiméricos (CAR) son un tipo de receptor dirigido a antígeno compuesto por dominios de señalización de células T intracelulares fusionados a fragmentos de unión a antígeno extracelulares, más
30 comúnmente fragmentos variables monocatenarios (scFv) de anticuerpos monoclonales. Los CAR reconocen directamente los antígenos de la superficie celular, independientemente de la presentación mediada por el MHC, lo que permite el uso de una única construcción de receptor específica para cualquier antígeno determinado en todos los pacientes. Los CAR iniciales fusionaron dominios de reconocimiento de antígenos con la cadena de activación CD3 ζ del complejo del receptor de células T (TCR). Las iteraciones posteriores de
35 CAR han incluido señales coestimuladoras secundarias junto con CD3 ζ , incluidos dominios intracelulares de CD28 o una variedad de moléculas de la familia de receptores de TNF, como 4-1BB (CD137) y OX40 (CD134). Además, los receptores de tercera generación incluyen dos señales coestimuladoras además de CD3 ζ , más comúnmente de CD28 y 4-1BB. Los CAR de segunda y tercera generación mejoraron drásticamente la eficacia antitumoral y, en algunos casos, indujeron remisiones completas en pacientes con cáncer avanzado.
40

- En general, se piensa que la cantidad de células T transferidas se correlaciona con las respuestas terapéuticas. Sin embargo, el número de células que se pueden administrar a un paciente para la transferencia de células T adoptivas es limitado y la generación de una gran cantidad de células T para la transferencia de células T adoptivas sigue siendo un desafío. Se podría lograr un aumento sustancial en la persistencia celular cuando
45 los pacientes recibieron un régimen preparativo de reducción de linfocitos antes de la infusión de TIL o células T modificadas con receptores. Sin embargo, la transferencia de una gran cantidad de células T modificadas genéticamente a un huésped vacío también plantea el riesgo de eventos adversos graves en caso de que el antígeno objetivo se exprese inesperadamente en un tejido normal relevante. Por lo tanto, sería deseable transferir una cantidad limitada de células T diseñadas que puedan expandirse en el paciente después de que
50 hayan demostrado ser seguras.

Xiao-Jun Xu et al. (2016) Oncotarget 7, 82354-82368 se preocupa por el impacto de varias interleucinas en las células T CAR *ex vivo* e *in vivo*.

- Los presentes inventores descubrieron que es posible expandir las células T CAR en un sujeto administrando ARN que codifica IL2 en combinación con ARN que codifica la citoquina adicional IL7 o IL21 y opcionalmente
55 usando vacunación con ARN para proporcionar antígeno para la estimulación de células T CAR. Los métodos de la divulgación permiten solo proporcionar pequeñas cantidades de células T diseñadas con CAR a un paciente y luego expandir las células T *in vivo*.

Resumen

El presente enfoque abarca generalmente el tratamiento de enfermedades dirigiéndose a células que expresan un antígeno en la superficie celular, tales como células enfermas que expresan un antígeno en la superficie celular, en particular células cancerosas que expresan un antígeno tumoral en la superficie celular. Los métodos prevén la erradicación selectiva de células que expresan en su superficie un antígeno, minimizando así los efectos adversos para las células normales que no expresan el antígeno. Las células T modificadas genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se dirige a las células mediante la unión al antígeno deben proporcionarse en un sujeto, por ejemplo mediante la administración de las células T. Se deben administrar IL2 o el ácido nucleico que la codifica y la citoquina adicional IL7 o IL21 o el ácido nucleico que la codifica. En una realización, el antígeno o una variante del mismo o el ácido nucleico que lo codifica se va a administrar para proporcionar (opcionalmente después de la expresión del ácido nucleico por células diana apropiadas) antígeno para la estimulación, cebado y/o expansión de células T. Las células T estimuladas, preparadas y/o expandidas en el paciente son capaces de reconocer células que expresan un antígeno en la superficie celular, como las células enfermas, lo que da como resultado la erradicación de las células enfermas. Se puede considerar que el enfoque actual implica inmunización pasiva y activa. El tratamiento que implica la administración de células T modificadas genéticamente para expresar un CAR puede considerarse una forma de inmunización pasiva. El tratamiento que implica la administración de un antígeno o una variante del mismo, estimulando así una respuesta inmunitaria mediada por células T a una población de células o tejido diana, puede considerarse como una forma de inmunización activa.

De acuerdo con la presente divulgación, la respuesta inmunitaria es a una población de células diana o tejido diana que expresa un antígeno en un mamífero y las células T genéticamente modificadas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) están dirigidas al antígeno. Los presentes métodos opcionalmente también implican la administración del antígeno o una variante del mismo. En una realización, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria mediada por células T. En una realización, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria antitumoral y la población de células diana o tejido diana son células tumorales o tejido tumoral.

Los métodos y agentes descritos aquí son particularmente efectivos si se administra ARN que codifica IL2 unido a un grupo modificador farmacocinético (en adelante referido como "IL2 de farmacocinética extendida (PK)"), en combinación con ARN que codifica otra citoquina, IL7 o IL21, también unida a un grupo modificador farmacocinético (en adelante referido como "citoquina de farmacocinética extendida (PK)"). Los métodos y agentes descritos en el presente documento son particularmente eficaces si el ARN que codifica la IL2 de PK extendida y/o el ARN que codifica la citoquina de PK extendida se dirigen al hígado para su disponibilidad sistémica. Las células del hígado se pueden transfectar de manera eficiente y pueden producir grandes cantidades de proteínas. El ARN que codifica antígenos se dirige preferentemente a órganos linfoides secundarios.

La presente invención está dirigida a lo siguiente:

En un aspecto, la invención proporciona una preparación médica que comprende:

- a. células T modificadas genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR),
- b. IL2 o un polinucleótido que codifica IL2, y
- c. una citoquina adicional o un polinucleótido que codifica la citoquina adicional, en el que la citoquina adicional se selecciona del grupo que consiste en IL7 e IL21.

En una realización, la preparación médica comprende IL2 o un polinucleótido que codifica IL2 e IL7 o un polinucleótido que codifica IL7. En una realización, la preparación médica comprende IL2 o un polinucleótido que codifica IL2 e IL21 o un polinucleótido que codifica IL21.

En una realización, el polinucleótido que codifica IL2 es ARN y opcionalmente el polinucleótido que codifica la citoquina adicional es ARN.

En una realización, la preparación médica comprende además un antígeno o una variante del mismo, o un polinucleótido que codifica el antígeno o variante, en el que las células T genéticamente modificadas para expresar un CAR están dirigidas al antígeno. En una realización, el polinucleótido que codifica el antígeno o variante es ARN.

En una realización, la preparación médica es un kit.

En una realización, la preparación médica comprende las células T genéticamente modificadas para expresar un CAR, la IL2 o el polinucleótido que codifica IL2, la citoquina adicional o el polinucleótido que codifica la citoquina adicional y opcionalmente el antígeno o una variante del mismo, o el polinucleótido que codifica la antígeno o variante en recipientes separados.

En una realización, la preparación médica comprende además instrucciones para el uso de la preparación médica para tratar o prevenir el cáncer en el que el antígeno es un antígeno asociado a tumor.

En una realización, la preparación médica es una composición farmacéutica.

5 En una realización, la composición farmacéutica comprende además uno o más portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto, la invención proporciona una preparación médica que comprende:

a. células T modificadas genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR),

b. ARN que codifica IL2, y

10 c. ARN que codifica otra citoquina, en el que la citoquina adicional se selecciona del grupo que consiste en IL7 e IL21.

En una realización, la preparación médica comprende ARN que codifica IL2 y ARN que codifica IL7. En una realización, la preparación médica comprende ARN que codifica IL2 y ARN que codifica IL21.

En una realización, la preparación médica comprende además ARN que codifica un antígeno o una variante del mismo, en el que las células T genéticamente modificadas para expresar un CAR están dirigidas al antígeno.

15 En una realización, la preparación médica es un kit.

En una realización, la preparación médica comprende las células T genéticamente modificadas para expresar un CAR, el ARN que codifica IL2, el ARN que codifica la citoquina adicional y, opcionalmente, el ARN que codifica un antígeno o una variante del mismo en recipientes separados.

20 En una realización, la preparación médica comprende además instrucciones para el uso de la preparación médica para tratar o prevenir el cáncer en el que el antígeno es un antígeno asociado a tumor.

En una realización, la preparación médica es una composición farmacéutica.

En una realización, la composición farmacéutica comprende además uno o más portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

25 En una realización de todos los aspectos, IL2 es IL2 farmacocinética (PK) extendida. En una realización, la IL2 de PK extendida comprende una proteína de fusión. En una realización, la proteína de fusión comprende una fracción IL2 y una fracción seleccionada del grupo que consiste en albúmina sérica, un fragmento de inmunoglobulina, transferrina, Fn3 y variantes de los mismos.

30 En una realización de todos los aspectos, la citoquina adicional es una citoquina farmacocinética extendida (PK). En una realización, la citoquina de PK extendida comprende una proteína de fusión. En una realización, la proteína de fusión comprende una fracción de citoquina y una fracción seleccionada del grupo que consiste en albúmina sérica, un fragmento de inmunoglobulina, transferrina, Fn3 y variantes de los mismos.

En una realización, la albúmina sérica comprende albúmina sérica de ratón o albúmina sérica humana.

En una realización, el fragmento de inmunoglobulina comprende un dominio Fc de inmunoglobulina.

35 En un aspecto, la invención proporciona la preparación médica descrita en el presente documento para uso farmacéutico. En una realización, el uso farmacéutico comprende un tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad o trastorno.

En un aspecto, la invención proporciona la preparación médica descrita en el presente documento para su uso en un método para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto, en el que el cáncer está asociado con la expresión o la expresión elevada de un antígeno asociado a un tumor.

40 Los métodos para el tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad o trastorno, incluido el cáncer, pueden comprender:

a. proporcionar al sujeto células T genéticamente modificadas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR),

b. administrar al sujeto IL2 o un polinucleótido que codifica IL2, y

45 c. administrar al sujeto una citoquina adicional o un polinucleótido que codifica la citoquina adicional, en el que la citoquina adicional se selecciona del grupo que consiste en IL7 e IL21.

El polinucleótido que codifica IL2 puede ser ARN y el polinucleótido que codifica la citoquina adicional puede ser ARN.

5 Las células T genéticamente modificadas para expresar un CAR se pueden proporcionar al sujeto al administrar las células T genéticamente modificadas para expresar un CAR o al generar las células T genéticamente modificadas para expresar un CAR en el sujeto.

10 Los métodos pueden comprender además administrar al sujeto un antígeno o una variante del mismo, o un polinucleótido que codifica el antígeno o variante, en el que las células T genéticamente modificadas para expresar un CAR están dirigidas al antígeno y la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria a una población de células diana o tejido diana que expresa el antígeno. El polinucleótido que codifica el antígeno o variante puede ser ARN.

En una realización de la preparación médica, el ARN está presente en una forma seleccionada entre una forma líquida, una forma sólida o una combinación de las mismas. En una realización, la forma sólida es una forma congelada o una forma deshidratada. En una realización, la forma deshidratada es una forma liofilizada o secada por aspersión.

15 En una realización, el cáncer descrito en el presente documento se selecciona del grupo que consiste en melanoma, leucemia, linfoma, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de colon, mesotelioma, carcinoma de células renales y cáncer de cerebro.

La invención está limitada por las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

20 Figura 1: mAlb-mIL-2 y mIL-7-mAlb potencian la expansión repetitiva in situ y específica de antígenos de células T CAR genéticamente modificadas in vivo en ratones preacondicionados. (A) Ratones C57BL/6BrdCrHsd-Tyr^c irradiados con 2.5 Gy (XRAD320) (n = 2-3/grupo) fueron injertados intravenosamente con 5×10^6 células T C57Bl/6-Thy1.1+ transducidas con CLDN6-CAR-BBz-Luc-GFP. Un día después, los ratones fueron tratados con una vacunación lipoplex de ARNm (20 mg, i.v.) que codifica hCLDN6 o Oval (ARN de control), seguido de
25 la administración intraperitoneal de ARNm formulado modificado con nucleósidos que codifica mAlb-mIL-2 y mIL-7-mAlb (1 mg de ARNm por ratón). Se utilizó un tampón como control simulado. Después de 7 días adicionales, el tratamiento se repitió. Se realizó una imagen de bioluminiscencia (BLI) para monitorear la expansión y persistencia desde el día 1 (valor inicial) hasta el día 15 después del ACT. (B) Expresión del transgén en células T transducidas murinas de CAR transferidas adoptivamente. Las células fueron teñidas con anticuerpos conjugados con fluorocromo dirigidos contra CD8 y CD4, así como con un anticuerpo específico de isotipo dirigido contra la parte scFv del CLDN6-CAR (anti-IMAB206) y analizadas por citometría de flujo. A la izquierda, las células fueron seleccionadas como linfocitos individuales; a la derecha, las células fueron seleccionadas como células T CD8+. (C) Imagen de bioluminiscencia de ratones en posición lateral en
30 varios puntos temporales después del ACT y tratamiento con ARN_(LIP) de antígeno en combinación con ARNm que codifica citoquinas-albumina como se indica. Las imágenes en colores alterados representan la intensidad de la luz (negro, menos intensa; blanco hasta gris oscuro, más intensa) que fue superpuesta sobre las imágenes de referencia en escala de grises. (D) El índice de expansión calculado (media \pm d.e.) del flujo total después de 4 y 11 días post ACT comparado con la valor inicial en el día 1; ACT: transferencia adoptiva de células T, TBI: irradiación total del cuerpo, BLI: imagen de bioluminiscencia, Luc: luciferasa de luciérnaga efectiva, mAlb: albúmina sérica murina, mIL-2: interleucina-2 murina, mIL-7: interleucina-7 murina.
40

Figura 2: mAlb-mIL-2 y mIL-7-mAlb prolongan la persistencia de células T CAR expandidas específicas de antígenos in vivo incluso en ratones inmunocompetentes. (A) Ratones C57BL/6BrdCrHsd-Tyr^c no irradiados (n = 2-3/grupo) recibieron la misma dosis de células T transducidas con CAR y fueron tratados como se describe en la leyenda de la Figura 1 A-B. (B) Formación de imágenes de bioluminiscencia de ratones en posición lateral
45 en varios puntos temporales después del ACT y tratamiento con ARN_(LIP) de antígeno en combinación con ARNm que codifica citoquinas-albumina como se indica. Las imágenes en colores alterados representan la intensidad de la luz (negro, menos intensa; blanco hasta gris oscuro, más intensa) que fue superpuesta sobre las imágenes de referencia en escala de grises. (C) El índice de expansión (media \pm desviación estándar) del flujo total después de 4 y 11 días post ACT comparado con la línea base en el día 1; ACT: transferencia adoptiva de células T, BLI: imagen de bioluminiscencia, Luc: luciferasa de luciérnaga efectiva, mAlb: albúmina sérica murina, mIL-2: interleucina-2 murina, mIL-7: interleucina-7 murina.
50

Figura 3: La presencia de mAlb-mIL-2 en combinación con mIL-7-mAlb o mIL-21-mAlb resultó en una acumulación de expansión específica del antígeno in situ repetitiva y persistencia prolongada de células T CAR genéticamente modificadas in vivo. (A) Ratones C57BL/6BrdCrHsd-Tyr^c irradiados con 2.5 Gy (n = 2-3/grupo) recibieron la misma dosis de células T transducidas con CAR y una vacunación lipoplex con ARNm codificando hCLDN6 u Oval (ARN de control) en combinación con diferentes citoquinas formuladas y modificadas con nucleósidos (1 mg por ARNm por animal utilizado) como se describe en la Figura 1A. (B) El aumento relativo en la bioluminiscencia de los ratones tratados fue cuantificado y calculado durante 3 rondas de vacunación (la
55

imagen se realizaba usualmente 2-3 días después de la ronda de tratamiento indicada con ARN de antígeno-ARN_(LIP) y ARN de citoquina). El índice de expansión se calculó de la siguiente manera: flujo total [p/s] de la ronda de expansión respectiva/flujo total [p/s] de la línea base en el día uno después del ACT (media ± e.e.m.). (CD) Cuantificación de la bioluminiscencia durante y después de las rondas de expansión con CLDN6-ARN_(LIP) en presencia de los ARN de citoquinas formuladas y modificadas con nucleósidos indicados (media +/- e.e.m.). Las flechas indican la vacunación con hCLDN6 RNA_(LIP) y el tratamiento con citoquinas formuladas y modificadas con nucleósidos (ribocitoquinas). ACT: transferencia adoptiva de células T, TBI: irradiación total del cuerpo, BLI: imagen de bioluminiscencia, Luc: luciferasa de luciérnaga efectiva, mAlb: albúmina sérica murina, mL-2: interleucina-2 murina, mL-7: interleucina-7 murina.

10 Descripción detallada

La presente divulgación proporciona enseñanzas que en algunos aspectos van más allá de la invención como tal, que se define exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas. Las enseñanzas se proporcionan para ubicar la invención real en un contexto técnico más amplio e ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados. Dicha información técnica adicional que no entra dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, no forma parte de la invención. En particular, no se debe interpretar que los términos "realización" y "aspecto" se refieren necesariamente a una realización de la invención, a menos que la "realización" o "aspecto" en cuestión esté dentro del alcance de las reivindicaciones.

Aunque la presente divulgación se describe en detalle a continuación, debe entenderse que esta divulgación no se limita a las metodologías, protocolos y reactivos particulares descritos en el presente documento, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende limitar el alcance de la presente divulgación, que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la técnica.

Preferiblemente, los términos utilizados en el presente documento se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel y H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza, (1995).

La práctica de la presente divulgación empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, biología celular, inmunología y técnicas de ADN recombinante que se explican en la literatura en el campo (cf., por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

El término "aproximadamente" significa aproximadamente o casi, y en el contexto de un valor o rango numérico establecido en el presente documento en una realización significa ± 20 %, ± 10 %, ± 5 % o ± 3 % del valor numérico o rango citado o reivindicado.

Los términos "un" y "una" y "el" y referencias similares utilizadas en el contexto de la descripción de la divulgación (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. La enumeración de rangos de valores en este documento simplemente pretende servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del rango. A menos que se indique lo contrario en este documento, cada valor individual se incorpora a la especificación como si se enumerara individualmente en este documento. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como"), proporcionados en este documento tiene como objetivo simplemente ilustrar mejor la divulgación y no plantea una limitación en el alcance de las reivindicaciones. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse como que indica algún elemento no reivindicado esencial para la práctica de la divulgación.

A menos que se especifique expresamente lo contrario, el término "que comprende" se utiliza en el contexto del presente documento para indicar que opcionalmente pueden estar presentes otros miembros además de los miembros de la lista introducida por "que comprende". Sin embargo, se contempla como una realización específica de la presente divulgación que el término "que comprende" abarca la posibilidad de que no haya más miembros presentes, es decir, para los fines de esta realización, se debe entender que "que comprende" tiene el significado de "que consiste en".

Se citan varios documentos a lo largo del texto de esta especificación. Nada de lo aquí contenido debe interpretarse como una admisión de que la presente divulgación no tenía derecho a anteceder dichos documentos.

A continuación, se proporcionarán definiciones que se aplican a todos los aspectos de la presente divulgación. Los siguientes términos tienen los siguientes significados a menos que se indique lo contrario. Cualquier término indefinido tiene su significado reconocido en de la técnica.

De acuerdo con la divulgación, el término "péptido" comprende oligopéptidos y polipéptidos y se refiere a sustancias que comprenden aproximadamente dos o más, aproximadamente 3 o más, aproximadamente 4 o más, aproximadamente 6 o más, aproximadamente 8 o más, aproximadamente 10 o más, aproximadamente 13 o más, aproximadamente 16 o más, aproximadamente 20 o más y hasta aproximadamente 50, aproximadamente 100 o aproximadamente 150 aminoácidos consecutivos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. El término "proteína" o "polipéptido" se refiere a péptidos grandes, en particular péptidos que tienen al menos aproximadamente 151 aminoácidos, pero los términos "péptido", "proteína" y "polipéptido" se utilizan aquí normalmente como sinónimos.

Una "proteína terapéutica" tiene un efecto positivo o ventajoso sobre una afección o estado patológico de un sujeto cuando se proporciona al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. En una realización, una proteína terapéutica tiene propiedades curativas o paliativas y puede administrarse para mejorar, aliviar, mitigar, revertir, retrasar la aparición o disminuir la gravedad de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno. Una proteína terapéutica puede tener propiedades profilácticas y puede usarse para retrasar la aparición de una enfermedad o para disminuir la gravedad de dicha enfermedad o afección patológica. El término "proteína terapéutica" incluye proteínas o péptidos completos, y también puede referirse a fragmentos terapéuticamente activos de los mismos. También puede incluir variantes terapéuticamente activas de una proteína. Ejemplos de proteínas terapéuticamente activas incluyen, entre otras, citoquinas.

"Fragmento", con referencia a una secuencia de aminoácidos (péptido o proteína), se refiere a una parte de una secuencia de aminoácidos, es decir, una secuencia que representa la secuencia de aminoácidos acortada en el terminal N y/o en el terminal C. Un fragmento acortado en el terminal C (fragmento terminal N) se puede obtener, por ejemplo mediante traducción de un marco de lectura abierto truncado que carece del extremo 3' del marco de lectura abierto. Un fragmento acortado en el terminal N (fragmento terminal C) se puede obtener, por ejemplo, mediante traducción de un marco de lectura abierto truncado que carece del extremo 5' del marco de lectura abierto, siempre que el marco de lectura abierto truncado comprenda un codón de inicio que sirva para iniciar la traducción. Un fragmento de una secuencia de aminoácidos comprende, por ejemplo, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % de los residuos de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos. Un fragmento de una secuencia de aminoácidos comprende preferiblemente al menos 6, en particular al menos 8, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 50 o al menos 100 aminoácidos consecutivos de una secuencia de aminoácido.

Para los fines de la presente divulgación, las "variantes" de una secuencia de aminoácidos (péptido o proteína) comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de adición de aminoácidos, variantes de delección de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos. El término "variante" incluye, en particular, fragmentos de una secuencia de aminoácidos.

Las variantes de inserción de aminoácidos comprenden inserciones de uno o dos o más aminoácidos en una secuencia de aminoácidos particular. En el caso de variantes de secuencia de aminoácidos que tienen una inserción, se insertan uno o más residuos de aminoácidos en un sitio particular en una secuencia de aminoácidos, aunque también es posible una inserción aleatoria con un cribado apropiado del producto resultante. Las variantes de adición de aminoácidos comprenden fusiones amino y/o carboxi terminales de uno o más aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o más aminoácidos. Las variantes de delección de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia, tal como por la eliminación de 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o más aminoácidos. Las eliminaciones pueden estar en cualquier posición de la proteína. Las variantes de delección de aminoácidos que comprenden la delección en el extremo terminal N y/o terminal C de la proteína también se denominan variantes de truncamiento terminal N y/o terminal C. Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de al menos un residuo de la secuencia y la inserción de otro residuo en su lugar. Se prefieren las modificaciones en posiciones de la secuencia de aminoácidos que no están conservadas entre proteínas o péptidos homólogos y/o la sustitución de aminoácidos por otros que tengan propiedades similares. Preferiblemente, los cambios de aminoácidos en variantes de péptidos y proteínas son cambios de aminoácidos conservadores, es decir, sustituciones de aminoácidos cargados o no cargados de manera similar. Un cambio de aminoácido conservador implica la sustitución de uno de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos naturales generalmente se dividen en cuatro familias: ácidos (aspartato, glutamato), básicos (lisina, arginina, histidina), no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) y aminoácidos polares no cargados (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos.

Preferiblemente, el grado de similitud, preferiblemente identidad, entre una secuencia de aminoácidos dada y una secuencia de aminoácidos que es una variante de dicha secuencia de aminoácidos dada será al menos aproximadamente 60 %, 65 %, 70 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %. El grado de similitud o identidad se proporciona preferiblemente para una región de aminoácidos que es al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 % o aproximadamente el 100 % de la longitud total de la secuencia de aminoácidos de referencia. Por ejemplo, si la secuencia de aminoácidos de referencia consta de 200 aminoácidos, el grado de similitud o identidad se proporciona preferiblemente para al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 160, al menos aproximadamente 180 o aproximadamente 200 aminoácidos, preferiblemente aminoácidos continuos. En realizaciones preferidas, el grado de similitud o identidad se proporciona para toda la longitud de la secuencia de aminoácidos de referencia. La alineación para determinar la similitud de secuencia, preferiblemente la identidad de secuencia, se puede realizar con herramientas conocidas en la técnica, preferiblemente usando la mejor alineación de secuencia, por ejemplo, usando Align, usando configuraciones estándar, preferiblemente EMBOSS::needle, Matrix: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5.

“Similitud de secuencia” indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que representan sustituciones de aminoácidos conservadoras. La “identidad de secuencia” entre dos secuencias de aminoácidos indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias.

El término “identidad porcentual” pretende indicar un porcentaje de residuos de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias a comparar, obtenido después del mejor alineamiento, siendo este porcentaje puramente estadístico y distribuyéndose las diferencias entre las dos secuencias aleatoriamente y en toda su longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos se llevan a cabo convencionalmente comparando estas secuencias después de haberlas alineado de manera óptima, realizándose dicha comparación por segmento o por “ventana de comparación” para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. El alineamiento óptimo de las secuencias a comparar puede producirse, además de manualmente, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482, mediante el algoritmo de homología local de Neddleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, mediante el método de búsqueda por similitud de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Acad. Natl. Sci. USA* 85, 2444, o mediante programas informáticos que utilizan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas entre las dos secuencias que se comparan, dividiendo este número por el número de posiciones comparadas y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

Las secuencias de aminoácidos homólogas presentan de acuerdo con la divulgación al menos el 40 %, en particular al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % y preferentemente al menos el 95 %, al menos el 98 %. o al menos 99 % de identidad de los residuos de aminoácidos.

Las variantes de secuencia de aminoácidos descritas en el presente documento pueden ser preparadas fácilmente por un experto, por ejemplo, mediante manipulación de ADN recombinante. La manipulación de secuencias de ADN para preparar péptidos o proteínas que tienen sustituciones, adiciones, inserciones o eliminaciones se describe en detalle en Sambrook et al. (1989), por ejemplo. Además, los péptidos y variantes de aminoácidos descritos en el presente documento se pueden preparar fácilmente con la ayuda de técnicas de síntesis de péptidos conocidas tales como, por ejemplo, mediante síntesis en fase sólida y métodos similares.

En una realización, un fragmento o variante de una secuencia de aminoácidos (péptido o proteína) es preferiblemente un “fragmento funcional” o “variante funcional”. El término “fragmento funcional” o “variante funcional” de una secuencia de aminoácidos se refiere a cualquier fragmento o variante que exhiba una o más propiedades funcionales idénticas o similares a las de la secuencia de aminoácidos de la que deriva, es decir, es funcionalmente equivalente. Con respecto a las citoquinas, una función particular es una o más actividades inmunomoduladoras exhibidas por la secuencia de aminoácidos de la cual se deriva el fragmento o variante y/o la unión a los receptores a los que se une la secuencia de aminoácidos de la cual se deriva el fragmento o variante.

Una secuencia de aminoácidos (péptido o proteína) “derivada de” una secuencia de aminoácidos designada (péptido o proteína) se refiere al origen de la primera secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos que se deriva de una secuencia de aminoácidos particular tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica, esencialmente idéntica u homóloga a esa secuencia particular o un fragmento de la misma. Las secuencias de aminoácidos derivadas de una secuencia de aminoácidos particular pueden ser variantes de esa secuencia particular o un fragmento de la misma. Por ejemplo, un experto en la técnica entenderá que los antígenos y citoquinas (por ejemplo, IL2, IL7 o IL21) adecuados para su uso en el presente documento

pueden alterarse de modo que varíen en secuencia de las secuencias naturales o nativas de las que se derivaron, conservando al mismo tiempo la actividad deseable de las secuencias nativas.

Células T

5 Las células T pertenecen a un grupo de glóbulos blancos conocidos como linfocitos y desempeñan una función central en la inmunidad mediada por células. Se pueden distinguir de otros tipos de linfocitos, como las células B y los linfocitos citolíticos naturales, por la presencia de un receptor especial en su superficie celular llamado receptores de células T (TCR). El timo es el principal órgano responsable de la maduración de las células T. Se han descubierto varios subconjuntos diferentes de células T, cada uno con una función distinta.

10 La mayoría de las células T tienen un receptor de células T (TCR) que existe como un complejo de varias proteínas. El receptor de células T real está compuesto por dos cadenas peptídicas separadas, que se producen a partir de los genes alfa y beta del receptor de células T independientes (TCR α y TCR β) y se denominan cadenas α y β -TCR. Las células T $\gamma\delta$ (células T gamma delta) representan un pequeño subconjunto de células T que poseen un receptor de células T (TCR) distinto en su superficie. Sin embargo, en las células T $\gamma\delta$, el TCR está formado por una cadena γ y una cadena δ . Este grupo de células T es mucho menos común (2 % del total de células T) que las células T $\alpha\beta$.

15 Todas las células T se originan a partir de células madre hematopoyéticas de la médula ósea. Los progenitores hematopoyéticos derivados de células madre hematopoyéticas pueblan el timo y se expanden por división celular para generar una gran población de timocitos inmaduros. Los timocitos más tempranos no expresan ni CD4 ni CD8 y, por lo tanto, se clasifican como células doble negativas (CD4-CD8-). A medida que avanzan en su desarrollo, se convierten en timocitos doblemente positivos (CD4+CD8+) y finalmente maduran hasta convertirse en timocitos monopositivos (CD4+CD8- o CD4-CD8+) que luego se liberan del timo a los tejidos periféricos.

20 Los términos "célula T" y "linfocito T" se usan indistintamente en el presente documento e incluyen células T colaboradoras (células T CD4+) y células T citotóxicas (CTL, células T CD8+) que comprenden células T citolíticas. El término "célula T específica de antígeno" o términos similares se refieren a una célula T que reconoce el antígeno al que se dirige la célula T, en particular cuando se presenta en la superficie de células presentadoras de antígeno o células enfermas tales como células cancerosas y preferiblemente ejerce funciones efectoras de las células T. Se considera que las células T son específicas del antígeno si matan a las células diana que expresan un antígeno. La especificidad de las células T se puede evaluar usando cualquiera de una variedad de técnicas estándar, por ejemplo, dentro de un ensayo de liberación de cromo o un ensayo de proliferación. Alternativamente, se puede medir la síntesis de linfocinas (como el interferón- γ).

25 Las células T colaboradoras ayudan a otros glóbulos blancos en procesos inmunológicos, incluida la maduración de células B en células plasmáticas y la activación de células T citotóxicas y macrófagos, entre otras funciones. Estas células también se conocen como células T CD4+ porque expresan la proteína CD4 en su superficie. Las células T auxiliares se activan cuando se les presentan antígenos peptídicos mediante moléculas MHC de clase II que se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC). Una vez activadas, se dividen rápidamente y secretan pequeñas proteínas llamadas citoquinas que regulan o ayudan en la respuesta inmunitaria activa.

30 Las células T citotóxicas destruyen las células infectadas por virus y las células tumorales, y también están implicadas en el rechazo de trasplantes. Estas células también se conocen como células T CD8+ porque expresan la glicoproteína CD8 en su superficie. Estas células reconocen sus objetivos uniéndose al antígeno asociado con el MHC de clase I, que está presente en la superficie de casi todas las células del cuerpo.

35 Las funciones efectoras mediadas por células T comprenden en el caso de una célula T colaboradora (célula T CD4+) la liberación de citoquinas y/o la activación de linfocitos CD8+ (CTL) y/o células B, y en el caso de CTL la eliminación de células, es decir, células caracterizadas por la expresión de un antígeno, por ejemplo, mediante apoptosis o lisis celular mediada por perforina, producción de citoquinas tales como IFN- γ y TNF- α , y destrucción citolítica específica de células diana que expresan antígenos.

De acuerdo con la divulgación, el término "célula T" también incluye una célula que puede madurar hasta convertirse en una célula T con una estimulación adecuada.

40 Las células T generalmente pueden prepararse *in vitro* o *ex vivo*, utilizando procedimientos estándar. Por ejemplo, las células T pueden aislarse de médula ósea, sangre periférica o una fracción de médula ósea o sangre periférica de un mamífero, tal como un paciente, usando un sistema de separación celular disponible comercialmente. Alternativamente, las células T pueden derivar de seres humanos, animales no humanos, estirpes celulares o cultivos relacionados o no relacionados. Una muestra que comprende células T pueden ser, por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

45 Las células T que se van a utilizar de acuerdo con la divulgación pueden expresar un receptor de células T endógeno o pueden carecer de expresión de un receptor de células T endógeno.

CAR

Los ácidos nucleicos tales como el ARN que codifica un CAR pueden introducirse en células T u otras células con potencial lítico, en particular células linfoides.

5 De acuerdo con la divulgación, un CAR que cuando está presente en una célula T reconoce un antígeno tal como en la superficie de células presentadoras de antígeno o células enfermas tales como células cancerosas, de manera que la célula T es estimulada, cebada y/o expandida o ejerce funciones efectoras como se describió anteriormente.

De acuerdo con la divulgación, el término "receptor de antígeno quimérico (CAR)" es sinónimo de los términos "receptor de células T quimérico" y "receptor de células T artificial".

10 Preferiblemente, dicho CAR se expresa en la superficie de las células.

De acuerdo con la divulgación, el término "CAR" (o "receptor de antígeno quimérico") se refiere a un receptor artificial que comprende una única molécula o un complejo de moléculas que reconoce, es decir, se une a, una estructura diana (por ejemplo, un antígeno) en una célula diana tal como una célula cancerosa (por ejemplo, mediante la unión de un dominio de unión a antígeno a un antígeno expresado en la superficie de la célula diana) y puede conferir especificidad a una célula inmunitaria efectora tal como una célula T que expresa dicho CAR en la superficie celular. Tales células no requieren necesariamente el procesamiento y la presentación de un antígeno para el reconocimiento de la célula diana sino que pueden reconocer preferiblemente con especificidad cualquier antígeno presente en una célula diana. Preferiblemente, el reconocimiento de la estructura diana por un CAR da como resultado la activación de una célula inmunitaria efectora que expresa dicho CAR. Un CAR puede comprender una o más unidades proteicas, dichas unidades proteicas comprende uno o más dominios como se describe en el presente documento. El término "CAR" no incluye receptores de células T.

De acuerdo con la divulgación, los CAR pueden comprender generalmente varios dominios. En una realización de todos los aspectos de la divulgación, el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización de células T.

El dominio de unión reconoce y se une al antígeno. En una realización, se usa como dominio de unión un fragmento variable monocatenario (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal. Los dominios de reconocimiento de antígenos que también pueden usarse incluyen, entre otros, cadenas simples alfa y beta del receptor de células T (TCR). De hecho, casi cualquier cosa que se une a un objetivo determinado con alta afinidad puede usarse como dominio de reconocimiento de antígeno. En una realización de todos los aspectos de la divulgación, un CAR comprende un dominio de unión a antígeno. En una realización, el dominio de unión al antígeno está comprendido por un exodominio de un CAR. En una realización, el dominio de unión al antígeno comprende un fragmento variable monocatenario (scFv) de un anticuerpo contra el antígeno. En una realización, el dominio de unión al antígeno comprende una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VH) con una especificidad por el antígeno (VH(antígeno)) y una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL) con una especificidad por el antígeno (VL(antígeno)). En una realización, dicha región variable de cadena pesada (VH) y la región variable de cadena ligera (VL) correspondiente están conectadas mediante un enlazador peptídico, preferiblemente un enlazador peptídico que comprende la secuencia de aminoácidos (GGGS)₃.

40 En una realización de todos los aspectos de la divulgación, un CAR comprende un dominio transmembrana. En una realización, el dominio transmembrana es una hélice alfa hidrófoba que atraviesa la membrana. En una realización, el dominio transmembrana comprende el dominio transmembrana CD28 o un fragmento del mismo.

El dominio de señalización de activación (o dominio de señalización de células T) sirve para activar los linfocitos citotóxicos tras la unión del CAR al antígeno. La identidad del dominio de señalización de activación está limitada únicamente porque tiene la capacidad de inducir la activación del linfocito citotóxico seleccionado tras la unión del antígeno por el CAR. Los dominios de señalización de activación adecuados incluyen la cadena CD3[zeta] de células T y el receptor Fc [gamma]. El experto entenderá que se pueden usar variantes de secuencia de estos dominios de señalización de activación señalados sin afectar negativamente a la divulgación, donde las variantes tienen la misma o similar actividad que el dominio en el que se modelan. Dichas variantes tendrán al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del dominio del que derivan.

En una realización, el dominio de señalización de células T está ubicado intracelularmente. En una realización, el dominio de señalización de células T comprende CD3-zeta, preferiblemente el endodominio de CD3-zeta, opcionalmente en combinación con CD28.

55 Otro dominio que puede estar presente es el dominio de coestimulación. El dominio de coestimulación sirve para mejorar la proliferación y supervivencia de los linfocitos citotóxicos tras la unión del CAR a una fracción objetivo. La identidad del dominio de coestimulación está limitada únicamente porque tiene la capacidad de

mejorar la proliferación y supervivencia celular tras la unión de la fracción objetivo por el CAR. Los dominios de coestimulación adecuados incluyen CD28, CD137 (4-1 BB), un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), CD134 (OX40), un miembro de la superfamilia de receptores TNFR, y CD278 (ICOS), una molécula coestimuladora de la superfamilia CD28 expresada en células T activadas. El experto entenderá que se pueden usar variantes de secuencia de estos dominios de coestimulación señalados sin afectar negativamente a la divulgación, donde las variantes tienen la misma o similar actividad que el dominio en el que se modelan. Dichas variantes tendrán al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del dominio del que derivan. En algunas realizaciones de la divulgación, las construcciones CAR comprenden dos dominios de coestimulación. Si bien las combinaciones particulares incluyen todas las variaciones posibles de los cuatro dominios señalados, los ejemplos específicos incluyen CD28+CD137 (4-1 BB) y CD28+CD134 (OX40).

Los CAR de la presente divulgación pueden comprender los dominios anteriores, juntos en forma de una proteína de fusión. Dichas proteínas de fusión comprenderán generalmente un dominio de unión, uno o más dominios de coestimulación y un dominio de señalización de activación, unidos en una dirección terminal N a terminal C. Sin embargo, los CAR de la presente divulgación no se limitan a esta disposición y son aceptables otras disposiciones e incluyen un dominio de unión, un dominio de señalización de activación y uno o más dominios de coestimulación. Se entenderá que debido a que el dominio de unión debe estar libre para unirse al antígeno, la colocación del dominio de unión en la proteína de fusión será generalmente tal que se logre la visualización de la región en el exterior de la célula. De la misma manera, debido a que los dominios de señalización de coestimulación y activación sirven para inducir la actividad y proliferación de los linfocitos citotóxicos, la proteína de fusión generalmente mostrará estos dos dominios en el interior de la célula. Los CAR pueden incluir elementos adicionales, como un péptido señal para garantizar la exportación adecuada de la proteína de fusión a la superficie de las células, un dominio transmembrana para garantizar que la proteína de fusión se mantenga como una proteína de membrana integral y un dominio bisagra (o región espaciadora) que imparte flexibilidad al dominio de unión y permite una fuerte unión al antígeno.

En una realización de todos los aspectos de la divulgación, un CAR comprende un péptido señal que dirige la proteína nascente hacia el retículo endoplásmico. En una realización, el péptido señal precede al dominio de unión al antígeno.

En una realización de todos los aspectos de la divulgación, un CAR comprende una región espaciadora que une el dominio de unión al antígeno al dominio transmembrana. En una realización, la región espaciadora permite que el dominio de unión al antígeno se oriente en diferentes direcciones para facilitar el reconocimiento del antígeno. En una realización, la región espaciadora comprende la región bisagra de IgG1.

En una realización de todos los aspectos de la divulgación, un CAR comprende la estructura:

NH₂ - péptido señal - dominio de unión a antígeno - región espaciadora - dominio transmembrana - dominio de señalización de células T - COOH.

En una realización de todos los aspectos de la divulgación, un CAR es preferiblemente específico para el antígeno al que está dirigido, en particular cuando está presente en la superficie de una célula tal como una célula enferma o una célula presentadora de antígeno.

En una realización de todos los aspectos de la divulgación, un CAR puede expresarse y/o estar presente en la superficie de una célula T, preferiblemente una célula T citotóxica. En una realización, la célula T reacciona con el antígeno al que se dirige el CAR.

Las células utilizadas en relación con el sistema CAR de la presente divulgación son preferiblemente células T, en particular linfocitos citotóxicos, preferiblemente seleccionadas de células T, en particular células T citotóxicas, linfocitos citolíticos naturales (NK) y células citolíticas activadas por linfocinas (LAK). Tras su activación, cada uno de estos linfocitos citotóxicos desencadena la destrucción de las células diana. Por ejemplo, las células T citotóxicas desencadenan la destrucción de las células diana mediante uno o ambos de los siguientes medios. Primero, tras la activación, las células T liberan citotoxinas como perforina, granzimas y granzulina. La perforina y la granzulina crean poros en la célula diana, y las granzimas ingresan a la célula y desencadenan una cascada de caspasas en el citoplasma que induce la apoptosis (muerte celular programada) de la célula. En segundo lugar, la apoptosis puede inducirse mediante la interacción del ligando Fas-Fas entre las células T y las células diana. Los linfocitos citotóxicos serán preferentemente células autólogas, aunque se pueden utilizar células heterólogas o células alogénicas.

La terapia de transferencia celular adoptiva con células T que expresan receptores de antígenos quiméricos es una terapia anticancerígena prometedora, ya que las células T modificadas con CAR pueden diseñarse para atacar prácticamente cualquier antígeno tumoral. Por ejemplo, las células T del paciente pueden diseñarse genéticamente (modificarse genéticamente) para expresar CAR dirigidos específicamente a antígenos en las células tumorales del paciente y luego infundirse nuevamente en el paciente.

De acuerdo con la divulgación, un CAR puede reemplazar la función de un receptor de células T y, en particular, puede conferir reactividad tal como actividad citolítica a una célula tal como una célula T. Sin embargo, a diferencia de la unión del receptor de células T a un complejo antígeno péptido-MHC, un CAR puede unirse a un antígeno, en particular cuando se expresa en la superficie celular.

5 Se pueden utilizar diversos métodos para introducir construcciones CAR en células T, incluida la transfección de ADN no viral, sistemas basados en transposones y sistemas basados en virus. La transfección de ADN no viral tiene un riesgo bajo de mutagénesis por inserción. Los sistemas basados en transposones pueden integrar transgenes de manera más eficiente que los plásmidos que no contienen un elemento integrador. Los sistemas basados en virus incluyen el uso de γ -retrovirus y vectores lentivirales. Los γ -retrovirus son relativamente fáciles de producir, transducen de manera eficiente y permanente células T, y han demostrado preliminarmente que son seguros desde el punto de vista de la integración en células T humanas primarias. Los vectores lentivirales también transducen células T de manera eficiente y permanente, pero su fabricación es más costosa. También son potencialmente más seguros que los sistemas basados en retrovirus.

10 En una realización de todos los aspectos de la divulgación, el método comprende además transfectar células T o progenitores de células T ya sea *ex vivo* o *in vivo* con un ácido nucleico que codifica el CAR para proporcionar células T genéticamente modificadas para expresar un CAR.

15 Se pueden producir células T CAR *in vivo*, y, por tanto, casi instantáneamente, utilizando nanopartículas dirigidas a las células T. Por ejemplo, las nanopartículas basadas en poli(β -aminoéster) pueden acoplarse a fragmentos f(ab) anti-CD3e para unirse a CD3 en células T. Para ello, los fragmentos f(ab) anti-CD3e pueden unirse covalentemente al ácido poliglútamico (PGA). El PGA rodea el núcleo de la partícula que comprende ácidos nucleicos y un exceso de polímero poli(β -aminoéster) (PBAE) y se une a él mediante interacción de carga. Al unirse a las células T, estas nanopartículas se endocitosan. Su contenido, por ejemplo el ADN plasmídico que codifica un antígeno antitumoral CAR, puede dirigirse al núcleo de las células T debido a la inclusión de péptidos que contienen secuencias asociadas a microtúbulos (MTAS) y señales de localización nuclear (NLS) unidas covalentemente al polímero PBAE. La inclusión de transposones que flanquean el casete de expresión del gen CAR y un plásmido separado que codifica una transposasa hiperactiva puede permitir la integración eficiente del vector CAR en los cromosomas. Tal sistema que permite la *in vivo* La producción de células T CAR después de la infusión de nanopartículas se describe en Smith et al. (2017) Nat. Nanotechnol. 12:813-820.

20 Otra posibilidad es utilizar el método CRISPR/Cas9 para colocar deliberadamente una secuencia codificante de CAR en un locus específico. Por ejemplo, los receptores de células T (TCR) existentes pueden desactivarse, mientras se desactiva el CAR y se lo coloca bajo el control regulador dinámico del promotor endógeno que, de otro modo, moderaría la expresión de TCR; véase, por ejemplo, Eyquem et al. (2017) Nature 543:113-117.

25 En una realización de todos los aspectos de la divulgación, las células T genéticamente modificadas para expresar un CAR se transfectan de manera estable o transitoria con ácido nucleico que codifica el CAR. Así, el ácido nucleico que codifica el CAR está integrado o no en el genoma de las células T.

En una realización de todos los aspectos de la divulgación, las células T o los progenitores de células T provienen del sujeto que se va a tratar. En una realización de todos los aspectos de la divulgación, las células T o los progenitores de células T provienen de un sujeto que es diferente del sujeto que se va a tratar.

30 En una realización de todos los aspectos de la divulgación, las células T pueden ser autólogas, alogénicas o singénicas para el sujeto que se va a tratar. Las células T pueden estar modificadas genéticamente *in vitro* para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido al antígeno.

En una realización de todos los aspectos de la divulgación, las células T modificadas genéticamente para expresar un CAR se inactivan para la expresión de un receptor de células T endógeno y/o HLA endógeno.

35 El término "autólogo" se utiliza para describir cualquier cosa que se derive del mismo tema. Por ejemplo, "trasplante autólogo" se refiere a un trasplante de tejido u órganos derivados del mismo sujeto. Tales procedimientos son ventajosos porque superan la barrera inmunológica que, de otro modo, daría lugar al rechazo.

40 El término "alogénico" se utiliza para describir cualquier cosa que se derive de diferentes individuos de la misma especie. Se dice que dos o más individuos son alogénicos entre sí cuando los genes en uno o más loci no son idénticos.

El término "singénico" se utiliza para describir cualquier cosa que se derive de individuos o tejidos que tienen genotipos idénticos, es decir, gemelos idénticos o animales de la misma cepa endogámica, o sus tejidos.

45 El término "heterólogo" se utiliza para describir algo que consta de múltiples elementos diferentes. Por ejemplo, la transferencia de la médula ósea de un individuo a otro individuo constituye un trasplante heterólogo. Un gen heterólogo es un gen derivado de una fuente distinta del sujeto.

ARN

El término "polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, pretende incluir ADN y ARN tales como ADN genómico, ADNc, ARNm, moléculas producidas de forma recombinante y sintetizadas químicamente. Un ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario. El ARN incluye ARN transcrito *in vitro* (ARN IVT) o ARN sintético. Según la invención se aísla preferentemente un polinucleótido.

Los ácidos nucleicos pueden estar comprendidos en un vector. El término "vector" como se usa en el presente documento incluye cualquier vector conocido por el experto, incluidos vectores plásmidos, vectores cósmidos, vectores fagos tales como fago lambda, vectores virales tales como vectores adenovirales o baculovirales, o vectores cromosómicos artificiales tales como cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC) o cromosomas artificiales P1 (PAC). Dichos vectores incluyen vectores de expresión así como de clonación. Los vectores de expresión comprenden plásmidos así como vectores virales y generalmente contienen una secuencia codificante deseada y secuencias de ADN apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular (por ejemplo, bacterias, levaduras, plantas, insectos o mamíferos) o en sistemas de expresión *in vitro*. Los vectores de clonación se utilizan generalmente para diseñar y amplificar un determinado fragmento de ADN deseado y pueden carecer de secuencias funcionales necesarias para la expresión de los fragmentos de ADN deseados.

En una realización de todos los aspectos de la divulgación, el ácido nucleico que codifica una citoquina o que codifica un antígeno o variante del mismo se expresa en células del sujeto tratado para proporcionar la citoquina o el antígeno o variante del mismo. En una realización de todos los aspectos de la divulgación, el ácido nucleico se expresa transitoriamente en células del mamífero. Por tanto, en una realización, el ácido nucleico no está integrado en el genoma de las células. En una realización de todos los aspectos de la divulgación, el ácido nucleico es ARN, preferiblemente ARN transcrito *in vitro*. En una realización de todos los aspectos de la divulgación, la expresión del antígeno o variante del mismo se produce en la superficie celular.

En una realización de todos los aspectos de la divulgación, el ácido nucleico que codifica el antígeno o variante del mismo se expresa en células del mamífero para proporcionar el antígeno o variante del mismo para que se una a las células T genéticamente modificadas para expresar un CAR, resultando dicha unión en estimulación, cebado y/o expansión de las células T genéticamente modificadas para expresar un CAR.

El término "expresión" se utiliza de acuerdo con la divulgación en su significado más general y comprende la producción de ARN y/o péptidos o proteínas, por ejemplo mediante transcripción y/o traducción. La expresión puede ser transitoria o estable. De acuerdo con la divulgación, el término expresión también incluye una "expresión aberrante" o "expresión anormal".

De acuerdo con la divulgación, el término "ácido nucleico codifica" significa que el ácido nucleico, si está presente en el entorno apropiado, tal como dentro de las células, puede expresarse para producir una proteína o péptido que codifica.

Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento pueden ser moléculas recombinantes y/o aisladas.

Una "molécula aislada", tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a una molécula que está sustancialmente libre de otras moléculas tales como otro material celular.

El término "recombinante" en el contexto de la presente divulgación significa "producido mediante ingeniería genética". Preferiblemente, un "objeto recombinante", tal como una célula recombinante en el contexto de la presente divulgación, no se produce de forma natural.

El término "de origen natural", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, un péptido o ácido nucleico que está presente en un organismo (incluidos los virus) y que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio es de origen natural.

El término "transfección" se refiere a la introducción de ácidos nucleicos, en particular ARN, en una célula. Para los fines de la presente divulgación, el término "transfección" también incluye la introducción de un ácido nucleico en una célula o la absorción de un ácido nucleico por dicha célula, en el que la célula puede estar presente en un sujeto, por ejemplo, un paciente. Así, de acuerdo con la presente divulgación, puede estar presente una célula para la transfección de un ácido nucleico descrito en el presente documento *in vitro* o en vivo, por ejemplo, la célula puede formar parte de un órgano, un tejido y/o un organismo de un paciente. De acuerdo con la divulgación, la transfección puede ser transitoria o estable. Para algunas aplicaciones de transfección, es suficiente que el material genético transfectado se exprese sólo de forma transitoria. Dado que el ácido nucleico introducido en el proceso de transfección normalmente no está integrado en el genoma nuclear, el ácido nucleico extraño se diluirá mediante mitosis o se degradará. Las células que permiten la amplificación episómica de ácidos nucleicos reducen en gran medida la tasa de dilución. Si se desea que el ácido nucleico transfectado permanezca realmente en el genoma de la célula y sus células hijas, debe

producirse una transfección estable. El ARN se puede transfectar en células para expresar transitoriamente su proteína codificada.

5 En una realización de todos los aspectos de la divulgación, el ácido nucleico que codifica una citoquina o que codifica un antígeno o variante del mismo se formula en un vehículo de administración tal como en partículas. En una realización, el vehículo de administración comprende al menos un lípido. En una realización, al menos un lípido comprende al menos un lípido catiónico. En una realización, el lípido forma un complejo con el ácido nucleico y/o lo encapsula. En una realización, el lípido está comprendido en una vesícula que encapsula el ácido nucleico. En una realización de todos los aspectos de la divulgación, el ácido nucleico se formula en liposomas.

10 En la presente divulgación, el término "ARN" se refiere a una molécula de ácido nucleico que incluye residuos de ribonucleótidos. En realizaciones preferidas, el ARN contiene todos o la mayoría de los residuos de ribonucleótidos. Como se usa en el presente documento, "ribonucleótido" se refiere a un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de un grupo β -D-ribofuranosa. El ARN abarca, sin limitación, ARN bicatenario, ARN monocatenario, ARN aislado tal como ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN producido de forma recombinante, así como ARN modificado que difiere del ARN natural por la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Tales alteraciones pueden referirse a la adición de material no nucleotídico a los nucleótidos internos del ARN o al (los) extremo(s) del ARN. También se contempla en el presente documento que los nucleótidos en el ARN pueden ser nucleótidos no estándar, tales como nucleótidos o desoxinucleótidos sintetizados químicamente. Para la presente divulgación, estos ARN alterados se consideran análogos del ARN natural.

15 En determinadas realizaciones de la presente divulgación, el ARN es ARN mensajero (ARNm) que se relaciona con un transcrito de ARN que codifica un péptido o proteína. Como se establece en la técnica, el ARNm generalmente contiene una región 5' no traducida (5'-UTR), una región codificante de péptidos y una región 3' no traducida (3'-UTR). En algunas realizaciones, el ARN se produce por transcripción *in vitro* o síntesis química. En una realización, el ARNm se produce por transcripción *in vitro* utilizando una plantilla de ADN donde el ADN se refiere a un ácido nucleico que contiene desoxirribonucleótidos.

20 En una realización, el ARN es ARN transcrito *in vitro* (IVT-ARN) y puede obtenerse mediante transcripción *in vitro* de una plantilla de ADN apropiada. El promotor para controlar la transcripción puede ser cualquier promotor de cualquier Polimerasa de ARN. Una plantilla de ADN para transcripción *in vitro* se puede obtener clonando un ácido nucleico, en particular ADNc, e introduciéndolo en un vector apropiado para transcripción *in vitro*. El ADNc puede obtenerse mediante transcripción inversa de ARN.

25 En una realización, el ARN puede tener ribonucleótidos modificados. Los ejemplos de ribonucleótidos modificados incluyen, sin limitación, 5-metilcitidina, pseudouridina y/o 1-metil-pseudouridina.

30 En algunas realizaciones, el ARN de acuerdo con la presente divulgación comprende una tapa 5'. En una realización, el ARN de la presente divulgación no tiene 5'-trifosfatos sin tapa. En una realización, el ARN puede modificarse mediante un análogo de tapa 5'. El término "tapa 5'" se refiere a una estructura que se encuentra en el extremo 5' de una molécula de ARNm y generalmente consiste en un nucleótido de guanosina conectado al ARNm mediante un enlace trifosfato de 5' a 5'. En una realización, esta guanosina está metilada en la posición 7. Proporcionar un ARN con una tapa 5' o un análogo de tapa 5' puede lograrse mediante transcripción *in vitro*, en la que la tapa 5' se expresa cotranscripcionalmente en la cadena de ARN, o puede unirse al ARN postranscripcionalmente utilizando enzimas de protección.

35 En algunas realizaciones, el ARN de acuerdo con la presente divulgación comprende una 5'-UTR y/o una 3'-UTR. El término "región no traducida" o "UTR" se refiere a una región en una molécula de ADN que se transcribe pero no se traduce en una secuencia de aminoácidos, o a la región correspondiente en una molécula de ARN, tal como una molécula de ARNm. Una región no traducida (UTR) puede estar presente en 5' (en dirección ascendente de la secuencia) de un marco de lectura abierto (5'-UTR) y/o 3' (en dirección descendente de la secuencia) de un marco de lectura abierto (3'-UTR). Una 5'-UTR, si está presente, se ubica en el extremo 5', en dirección ascendente de la secuencia del codón de inicio de una región que codifica una proteína. Una 5'-UTR está en dirección descendente de la secuencia de la tapa 5' (si está presente), por ejemplo, directamente adyacente a la tapa 5'. Una 3'-UTR, si está presente, se localiza en el extremo 3', en dirección descendente de la secuencia del codón de terminación de una región que codifica una proteína, pero el término "3'-UTR" preferiblemente no incluye la cola poli(A). Por tanto, la 3'-UTR está arriba de la secuencia poli(A) (si está presente), por ejemplo, directamente adyacente a la secuencia poli(A).

40 En algunas realizaciones, el ARN de acuerdo con la presente divulgación comprende una secuencia 3'-poli(A). El término "secuencia poli(A)" se refiere a una secuencia de residuos de adenilo (A) que normalmente está situada en el extremo 3' de una molécula de ARN. De acuerdo con la divulgación, en una realización, una secuencia poli(A) comprende al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 80 o al menos aproximadamente 100, y hasta aproximadamente 500, hasta

aproximadamente 400, hasta aproximadamente 300, hasta aproximadamente 200 o hasta aproximadamente 150 nucleótidos A, y en particular aproximadamente 120 nucleótidos A.

5 En el contexto de la presente divulgación, el término "transcripción" se refiere a un proceso en el que el código genético en una secuencia de ADN se transcribe en ARN. Posteriormente, el ARN puede traducirse en péptido o proteína.

Con respecto al ARN, el término "expresión" o "traducción" se relaciona con el proceso en los ribosomas de una célula mediante el cual una cadena de ARNm dirige el ensamblaje de una secuencia de aminoácidos para formar un péptido o proteína.

10 De acuerdo con la divulgación, el término "ARN codifica" significa que el ARN, si está presente en el entorno apropiado, tal como dentro de las células de un tejido diana, puede dirigir el ensamblaje de aminoácidos para producir el péptido o proteína que codifica durante el proceso de traducción. En una realización, el ARN es capaz de interactuar con la maquinaria de traducción celular permitiendo la traducción del péptido o proteína. Una célula puede producir el péptido o proteína codificado intracelularmente (por ejemplo, en el citoplasma y/o en el núcleo), puede secretar el péptido o proteína codificado, o puede producirlo en la superficie.

15 Tal como se usan en el presente documento, los términos "enlazado", "fusionado" o "fusión" se usan indistintamente. Estos términos se refieren a la unión de dos o más elementos o componentes o dominios.

20 Como se utiliza en el presente documento, "vida media" se refiere al tiempo que tarda la concentración sérica o plasmática de un péptido o proteína en reducirse en un 50 % en vivo, por ejemplo, debido a degradación y/o eliminación o secuestro por mecanismos naturales. Se estabiliza una citoquina de PK extendida tal como interleucina (IL) de PK extendida adecuada para su uso en el presente documento en vivo y su vida media aumentada, por ejemplo, por fusión con albúmina sérica (por ejemplo, HSA o MSA), que resisten la degradación y/o la eliminación o el secuestro. La vida media se puede determinar de cualquier manera conocida per se, tal como mediante análisis farmacocinético. Las técnicas adecuadas serán claras para el experto en la técnica y, por ejemplo, generalmente pueden implicar las etapas de administrar adecuadamente una dosis adecuada de la secuencia de aminoácidos o compuesto a un sujeto; recoger muestras de sangre u otras muestras de dicho sujeto a intervalos regulares; determinar el nivel o concentración de la secuencia de aminoácidos o compuesto en dicha muestra de sangre; y calcular, a partir de (un gráfico de) los datos así obtenidos, el tiempo hasta que el nivel o concentración de la secuencia de aminoácidos o compuesto se haya reducido en un 50 % en comparación con el nivel inicial tras la dosificación. Se proporcionan más detalles, por ejemplo, en manuales estándar, como Kenneth, A. et al., *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists and in* Peters et al., *Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach* (1996). Reference is also made to Gibaldi, M. et al., *Pharmacokinetics*, 2nd Rev. Edition, Marcel Dekker (1982).

Citoquinas

35 Las citoquinas son una categoría de proteínas pequeñas (-5-20 kDa) que son importantes en la señalización celular. Su liberación tiene un efecto sobre el comportamiento de las células que las rodean. Las citoquinas participan en la señalización autocrina, la señalización paracrina y la señalización endocrina como agentes inmunomoduladores. Las citoquinas incluyen quimiocinas, interferones, interleucinas, linfocinas y factores de necrosis tumoral, pero generalmente no hormonas ni factores de crecimiento (a pesar de cierta superposición en la terminología). Las citoquinas son producidas por una amplia gama de células, incluidas células inmunes como macrófagos, linfocitos B, linfocitos T y mastocitos, así como células endoteliales, fibroblastos y diversas células estromales. Una citoquina determinada puede ser producida por más de un tipo de célula. Las citoquinas actúan a través de receptores y son especialmente importantes en el sistema inmunitario; Las citoquinas modulan el equilibrio entre las respuestas inmunes humorales y celulares, y regulan la maduración, el crecimiento y la capacidad de respuesta de poblaciones celulares particulares. Algunas citoquinas potencian o inhiben la acción de otras citoquinas de formas complejas.

IL2

50 La interleucina-2 (IL2) es una citoquina que induce la proliferación de células T activadas por antígenos y estimula los linfocitos citolíticos naturales (NK). La actividad biológica de IL2 está mediada a través de un complejo receptor de IL2 de múltiples subunidades (IL2R) de tres subunidades polipeptídicas que abarcan la membrana celular: p55 (IL2R α , la subunidad alfa, también conocida como CD25 en humanos), p75 (IL2R β , la subunidad beta, también conocida como CD122 en humanos) y p64 (IL2R γ , la subunidad gamma, también conocida como CD 132 en humanos). La respuesta de las células T a la IL2 depende de una variedad de factores, que incluyen: (1) la concentración de IL2; (2) el número de moléculas de IL2R en la superficie celular; y (3) el número de IL2R ocupados por IL2 (es decir, la afinidad de la interacción de unión entre IL2 e IL2R (Smith, "Cell Growth Signal Transduction is Quantal" In *Receptor Activation by Antigens, Cytokines, Hormones, and Growth Factors* 766:263-271, 1995)). El complejo IL2:IL2R se internaliza tras la unión del ligando y los diferentes componentes se someten a una clasificación diferencial. Cuando se administra en forma de bolo intravenoso (i.v.), la IL2 tiene una eliminación sistémica rápida (una fase de eliminación inicial con una vida

media de 12.9 minutos seguida de una fase de eliminación más lenta con una vida media de 85 minutos) (Konrad y col., Cancer Res. 50:2009-2017, 1990).

5 Los resultados de la administración sistémica de IL2 en pacientes con cáncer están lejos de ser ideales. Si bien entre el 15 y el 20 por ciento de los pacientes responden objetivamente a dosis altas de IL2, la gran mayoría no lo hace y muchos sufren efectos secundarios graves que ponen en peligro la vida, como náuseas, confusión, hipotensión y choque séptico. La toxicidad grave asociada con el tratamiento con dosis altas de IL2 se puede atribuir en gran medida a la actividad de los linfocitos citolíticos naturales (NK). Se han intentado reducir la concentración sérica reduciendo la dosis y ajustando el régimen de dosificación y, si bien son menos tóxicos, dichos tratamientos también fueron menos eficaces.

10 De acuerdo con la divulgación, en determinadas realizaciones, la IL2 está unida a un grupo modificador farmacocinético. La molécula resultante, denominada en lo sucesivo "IL2 farmacocinética extendida (PK)", tiene una vida media en circulación prolongada en relación con la IL2 libre. La prolongada vida media en circulación de la PK extendida IL2 permite en vivo Las concentraciones séricas de IL2 se mantienen dentro de un rango terapéutico, lo que potencialmente conduce a una mayor activación de muchos tipos de células inmunes, incluidas las células T. Debido a su perfil farmacocinético favorable, la IL2 de PK extendida se puede dosificar con menos frecuencia y durante períodos de tiempo más prolongados en comparación con la IL2 no modificada.

15 De acuerdo con la divulgación, IL2 (opcionalmente como una porción de IL2 de PK extendida) puede ser IL2 de origen natural o un fragmento o variante de la misma. La IL2 puede ser IL2 humana y puede derivar de cualquier vertebrado, especialmente de cualquier mamífero. En una realización, IL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a SEQ ID NO: 1. En una realización, IL2 o un fragmento o variante de IL2 se une al receptor de IL2, o una subunidad del receptor de IL2 tal como la subunidad alfa y/o la subunidad beta/gamma.

20 En determinadas realizaciones, la fracción IL2 de la IL2 de PK extendida es IL2 humana. En otras realizaciones, la fracción IL2 de la IL2 de PK extendida es un fragmento o variante de la IL2 humana.

25 En ciertas realizaciones descritas en el presente documento, la IL2 está fusionada a un polipéptido heterólogo (es decir, un polipéptido que no es IL2). El polipéptido heterólogo puede aumentar la vida media circulante de IL2. Como se analiza con mayor detalle más adelante, el polipéptido que aumenta la vida media circulante puede ser albúmina sérica, tal como la albúmina sérica humana (por ejemplo, SEQ ID NO: 4) o de ratón (por ejemplo, SEQ ID NO: 8, 11).

IL7

30 IL7 es un factor de crecimiento hematopoyético secretado por células estromales en la médula ósea y el timo. También lo producen los queratinocitos, las células dendríticas, los hepatocitos, las neuronas y las células epiteliales, pero no los linfocitos normales. IL7 es una citoquina importante para el desarrollo de células B y T. La citoquina IL7 y el factor de crecimiento de hepatocitos forman un heterodímero que funciona como factor estimulante del crecimiento de células prepro-B. Estudios de modificación génica en ratones sugirieron que la IL7 desempeña una función esencial en la supervivencia de las células linfoides.

35 IL7 se une al receptor de IL7, un heterodímero que consta del receptor α de IL7 y el receptor de cadena γ común. La unión da como resultado una cascada de señales importantes para el desarrollo de células T dentro del timo y la supervivencia en la periferia. Los ratones modificados que genéticamente carecen del receptor IL7 presentan atrofia tímica, detención del desarrollo de células T en la etapa doble positiva y linfopenia grave. La administración de IL7 a ratones produce un aumento de los emigrantes tímicos recientes, aumentos de células B y T y una mayor recuperación de células T después de la administración de ciclofosfamida o después de un trasplante de médula ósea.

40 De acuerdo con la divulgación, en determinadas realizaciones, la IL7 está unida a un grupo modificador farmacocinético. La molécula resultante, denominada en lo sucesivo "IL7 farmacocinética extendida (PK)", tiene una vida media en circulación prolongada en relación con la IL7 libre. La prolongada vida media en circulación de la PK extendida IL7 permite en vivo Las concentraciones séricas de IL7 se mantendrán dentro de un rango terapéutico, lo que podría conducir a una mayor supervivencia de muchos tipos de células inmunitarias, incluidas las células T. Debido a su perfil farmacocinético favorable, la IL7 de PK extendida se puede dosificar con menos frecuencia y durante períodos de tiempo más prolongados en comparación con la IL7 no modificada.

45 De acuerdo con la divulgación, IL7 (opcionalmente como una porción de IL7 de PK extendida) puede ser IL7 de origen natural o un fragmento o variante de la misma. La IL7 puede ser IL7 humana y puede derivar de cualquier vertebrado, especialmente de cualquier mamífero. En una realización, IL7 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a SEQ ID NO: 2. En una realización, IL7 o un fragmento o variante de IL7 se une al receptor de IL7.

En determinadas realizaciones, la fracción IL7 de la IL7 de PK extendida es IL7 humana. En otras realizaciones, la fracción IL7 de la IL7 de PK extendida es un fragmento o variante de la IL7 humana.

5 En ciertas realizaciones descritas en el presente documento, IL7 está fusionada a un polipéptido heterólogo (es decir, un polipéptido que no es IL7). El polipéptido heterólogo puede aumentar la vida media circulante de IL7. Como se analiza con mayor detalle más adelante, el polipéptido que aumenta la vida media circulante puede ser albúmina sérica, tal como albúmina sérica humana (por ejemplo, SEQ ID NO: 4) o de ratón (por ejemplo, SEQ ID NO: 8, 11).

IL21

10 La interleucina-21 (IL21) es una citoquina que tiene potentes efectos reguladores sobre las células del sistema inmunitario, incluidas los linfocitos citolíticos naturales (NK) y las células T citotóxicas. Esta citoquina induce la división/proliferación celular en sus células diana. IL21 se expresa en células T CD4+ humanas activadas, pero no en la mayoría de los demás tejidos. Además, la expresión de IL21 está regulada positivamente en los subconjuntos Th2 y Th17 de células T colaboradoras, así como en las células T foliculares. Además, la IL21 se expresa en las células T NK y regula la función de estas células. La interleucina21 también es producida por
15 las células cancerosas del linfoma de Hodgkin (HL).

El receptor IL21 (IL21R) se expresa en la superficie de las células T, B y NK. IL21R tiene una estructura similar a los receptores de otras citoquinas de tipo I como IL2 o IL-15 y requiere dimerización con la cadena gamma común (γ) para unirse a IL-21. Cuando se une a IL21, el receptor de IL21 actúa a través de la vía Jak/STAT, utilizando Jak1 y Jak3 y un homodímero STAT3 para activar sus genes diana.

20 De acuerdo con la divulgación, en determinadas realizaciones, la IL21 está unida a un grupo modificador farmacocinético. La molécula resultante, denominada en lo sucesivo "IL21 farmacocinética extendida (PK)", tiene una vida media en circulación prolongada en relación con la IL21 libre. La vida media en circulación prolongada de la PK extendida IL21 permite concentraciones séricas in vivo de IL21 se mantienen dentro de un rango terapéutico, lo que potencialmente conduce a una mayor activación de muchos tipos de células inmunes, incluidas las células T. Debido a su perfil farmacocinético favorable, la IL21 de PK extendida se puede dosificar con menos frecuencia y durante períodos de tiempo más prolongados en comparación con la IL21 no modificada.
25

De acuerdo con la divulgación, IL21 (opcionalmente como una porción de IL21 de PK extendida) puede ser IL21 de origen natural o un fragmento o variante de la misma. La IL21 puede ser IL21 humana y puede derivar de cualquier vertebrado, especialmente de cualquier mamífero. En una realización, IL21 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a SEQ ID NO: 3. En una realización, IL21 o un fragmento o variante de IL21 se une al receptor de IL21.
30

35 En determinadas realizaciones, la fracción IL21 de la IL21 de PK extendida es IL21 humana. En otras realizaciones, la fracción IL21 de la IL21 de PK extendida es un fragmento o variante de la IL21 humana.

En ciertas realizaciones descritas en el presente documento, IL21 está fusionada a un polipéptido heterólogo (es decir, un polipéptido que no es IL21). El polipéptido heterólogo puede aumentar la vida media circulante de IL21. Como se analiza con mayor detalle más adelante, el polipéptido que aumenta la vida media circulante puede ser albúmina sérica, tal como la albúmina sérica humana (por ejemplo, SEQ ID NO: 4) o de ratón (por ejemplo, SEQ ID NO: 8, 11).
40

Grupo PK extendido

45 Las citoquinas, por ejemplo interleucinas, descritas en el presente documento, tales como IL2, IL7 o IL21, pueden fusionarse a un grupo PK extendido, lo que aumenta la vida media en circulación. A continuación se describen ejemplos no limitantes de grupos PK extendidos. Debe entenderse que otros grupos PK que aumentan la vida media en circulación de las citoquinas, o variantes de las mismas, también son aplicables a la presente divulgación. En determinadas realizaciones, el grupo PK extendido es un dominio de albúmina sérica (por ejemplo, albúmina sérica de ratón, albúmina sérica humana).

50 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "PK" es un acrónimo de "farmacocinética" y abarca propiedades de un compuesto que incluyen, a modo de ejemplo, absorción, distribución, metabolismo y eliminación por parte de un sujeto. Como se usa en el presente documento, un "grupo PK extendido" se refiere a una proteína, péptido o fracción que aumenta la vida media en circulación de una molécula biológicamente activa cuando se fusiona o se administra junto con la molécula biológicamente activa. Los ejemplos de un grupo PK extendido incluyen albúmina sérica (por ejemplo, HSA), Fc o fragmentos Fc y variantes de los mismos, transferrina y variantes de los mismos, y aglutinantes de albúmina sérica humana (HSA) (como se divulga en Publicaciones de EE. UU. Nos. 2005/0287153 y 2007/0003549). Otros grupos de PK extendida ejemplares se describen en Kontermann et al., Opinión actual en biotecnología 2011; 22: 868-876. Como se usa en el presente
55

documento, una "citoquina de PK extendida" se refiere a una fracción de citoquina en combinación con un grupo de PK extendida. En una realización, la citoquina de PK extendida es una proteína de fusión en la que una fracción de citoquina está unido o fusionado a un grupo de PK extendida. Como se usa en el presente documento, una "IL de PK extendida" se refiere a una fracción de interleucina (IL) en combinación con un grupo de PK extendida. En una realización, la IL de PK extendida es una proteína de fusión en la que una fracción de IL está unido o fusionado a un grupo de PK extendida. Una proteína de fusión ejemplar es una fusión HSA/IL2 en la que una fracción IL2 se fusiona con HSA. Otra proteína de fusión ejemplar es una fusión HSA/IL7 en la que una fracción IL7 se fusiona con HSA. Otra proteína de fusión ejemplar es una fusión HSA/IL21 en la que una fracción IL21 se fusiona con HSA.

En determinadas realizaciones, la vida media en suero de una citoquina de PK extendida aumenta en relación con la citoquina sola (es decir, la citoquina no fusionada a un grupo de PK extendida). En determinadas realizaciones, la vida media en suero de la citoquina de PK extendida es al menos un 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 200, 400, 600, 800 o 1000 % más larga en relación con la vida media en suero de la citoquina sola. En determinadas realizaciones, la vida media en suero de la citoquina de PK extendida es al menos 1.5 veces, 2 veces, 2.5 veces, 3 veces, 3.5 veces, 4 veces, 4.5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 10 veces, 12 veces, 13 veces, 15 veces, 17 veces, 20 veces, 22 veces, 25 veces, 27 veces, 30 veces, 35, 40 o 50 veces mayor que la vida media sérica de la citoquina sola. En determinadas realizaciones, la vida media en suero de la citoquina de PK extendida es al menos 10 horas, 15 horas, 20 horas, 25 horas, 30 horas, 35 horas, 40 horas, 50 horas, 60 horas, 70 horas, 80 horas, 90 horas, 100 horas, 110 horas, 120 horas, 130 horas, 135 horas, 140 horas, 150 horas, 160 horas o 200 horas.

En ciertas realizaciones, el grupo PK extendido incluye albúmina sérica, o fragmentos de la misma o variantes de la albúmina sérica o fragmentos de la misma (todos los cuales, para los fines de la presente divulgación, están comprendidos por el término "albúmina"). Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden fusionarse con albúmina (o un fragmento o variante de la misma) para formar proteínas de fusión de albúmina. Dichas proteínas de fusión de albúmina se describen en Publicación de EE. UU. No. 20070048282.

Como se usa en el presente documento, "proteína de fusión de albúmina" se refiere a una proteína formada por la fusión de al menos una molécula de albúmina (o un fragmento o variante de la misma) con al menos una molécula de una proteína tal como una proteína terapéutica, en particular IL2, IL7 o IL21 (o fragmento o variante de los mismos). La proteína de fusión de albúmina puede generarse mediante traducción de un ácido nucleico en el que un polinucleótido que codifica una proteína terapéutica se une en marco con un polinucleótido que codifica una albúmina. La proteína terapéutica y la albúmina, que alguna vez fueron parte de la proteína de fusión de albúmina, pueden denominarse cada una como una "porción", "región" o "fracción" de la proteína de fusión de albúmina (por ejemplo, una "porción de proteína terapéutica" o una "porción proteica de albúmina"). En una realización muy preferida, una proteína de fusión de albúmina comprende al menos una molécula de una proteína terapéutica (que incluye, entre otras, una forma madura de la proteína terapéutica) y al menos una molécula de albúmina (que incluye, entre otras, una forma madura de albúmina). En una realización, una proteína de fusión de albúmina es procesada por una célula huésped tal como una célula del órgano diana para el ARN administrado, por ejemplo, una célula del hígado y se secreta a la circulación. El procesamiento de la proteína de fusión de albúmina naciente que se produce en las vías secretoras de la célula huésped utilizada para la expresión del ARN puede incluir, pero no se limita a, escisión del péptido señal; formación de enlaces disulfuro; plegado adecuado; adición y procesamiento de carbohidratos (tales como, por ejemplo, glicosilación ligada a N y O); escisiones proteolíticas específicas; y/o ensamblaje en proteínas multiméricas. Una proteína de fusión de albúmina está codificada preferentemente por ARN en una forma no procesada que en particular tiene un péptido señal en su terminal N y después de la secreción por una célula está presente preferentemente en la forma procesada, en la que en particular el péptido señal ha sido escindido. En una realización más preferida, la "forma procesada de una proteína de fusión de albúmina" se refiere a un producto de proteína de fusión de albúmina que se ha sometido a escisión del péptido señal terminal N, también denominada en el presente documento "proteína de fusión de albúmina madura".

En realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de albúmina que comprenden una proteína terapéutica tienen una estabilidad plasmática mayor en comparación con la estabilidad plasmática de la misma proteína terapéutica cuando no están fusionadas con albúmina. La estabilidad plasmática generalmente se refiere al período de tiempo entre el momento en que se administra la proteína terapéutica en vivo y transportada al torrente sanguíneo y cuando la proteína terapéutica se degrada y elimina del torrente sanguíneo, a un órgano, como el riñón o el hígado, que finalmente elimina la proteína terapéutica del cuerpo. La estabilidad plasmática se calcula en términos de la vida media de la proteína terapéutica en el torrente sanguíneo. La vida media de la proteína terapéutica en el torrente sanguíneo puede determinarse fácilmente mediante ensayos comunes conocidos en la técnica.

Como se usa en el presente documento, "albúmina" se refiere colectivamente a una proteína albúmina o una secuencia de aminoácidos, o un fragmento o variante de albúmina, que tiene una o más actividades funcionales (por ejemplo, actividades biológicas) de la albúmina. En particular, "albúmina" se refiere a albúmina humana o fragmentos o variantes de la misma, especialmente la forma madura de albúmina humana, o albúmina de otros vertebrados o fragmentos de la misma, o variantes de estas moléculas. La albúmina puede derivar de cualquier

vertebrado, especialmente cualquier mamífero, por ejemplo humano, vaca, oveja o cerdo. Las albúminas de no mamíferos incluyen, pero no se limita a, gallina y salmón. La porción de albúmina de la proteína de fusión de albúmina puede ser de un animal diferente a la porción de proteína terapéutica.

5 En determinadas realizaciones, la albúmina es albúmina sérica humana (HSA), o fragmentos o variantes de la misma, tales como los divulgados en US 5,876,969, WO 2011/124718, WO 2013/075066, y WO 2011/0514789.

Los términos albúmina sérica humana (HSA) y albúmina humana (HA) se utilizan indistintamente en el presente documento. Los términos "albúmina y "albúmina sérica" son más amplios y abarcan la albúmina sérica humana (y fragmentos y variantes de la misma), así como la albúmina de otras especies (y fragmentos y variantes de la misma).

10 Como se usa en el presente documento, un fragmento de albúmina suficiente para prolongar la actividad terapéutica o la estabilidad plasmática de la proteína terapéutica se refiere a un fragmento de albúmina suficiente en longitud o estructura para estabilizar o prolongar la actividad terapéutica o la estabilidad plasmática de la proteína de modo que la estabilidad plasmática de la porción proteica terapéutica de la proteína de fusión de albúmina se prolonga o se extiende en comparación con la estabilidad del plasma en el estado de
15 no fusión.

La porción de albúmina de las proteínas de fusión de albúmina puede comprender la longitud completa de la secuencia de albúmina, o puede incluir uno o más fragmentos de la misma que son capaces de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica o la estabilidad del plasma. Dichos fragmentos pueden tener 10 o más aminoácidos de longitud o pueden incluir aproximadamente 15, 20, 25, 30, 50 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de albúmina o pueden incluir parte o todos los dominios específicos de albúmina. Por ejemplo,
20 pueden usarse uno o más fragmentos de HSA que abarcan los dos primeros dominios similares a inmunoglobulinas. En una realización preferida, el fragmento HSA es la forma madura de HSA.

En términos generales, un fragmento o variante de albúmina tendrá al menos 100 aminoácidos de longitud, preferiblemente al menos 150 aminoácidos de longitud.

25 De acuerdo con la divulgación, la albúmina puede ser albúmina natural o un fragmento o variante de la misma. La albúmina puede ser albúmina humana y puede derivarse de cualquier vertebrado, especialmente de cualquier mamífero. En una realización, la albúmina comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a SEQ ID NO: 4.

30 Preferiblemente, la proteína de fusión de albúmina comprende albúmina como porción terminal N y una proteína terapéutica como porción terminal C. Alternativamente, también se puede usar una proteína de fusión de albúmina que comprende albúmina como porción terminal C y una proteína terapéutica como porción terminal N. En otras realizaciones, la proteína de fusión de albúmina tiene una proteína terapéutica fusionada tanto al terminal N como al terminal C de la albúmina. En una realización preferida, las proteínas terapéuticas fusionadas en los terminales N y C son las mismas proteínas terapéuticas. En otra realización preferida, las
35 proteínas terapéuticas fusionadas en los terminales N y C son proteínas terapéuticas diferentes. En una realización, las diferentes proteínas terapéuticas pueden ser útiles para tratar o prevenir la misma enfermedad, trastorno o afección o una relacionada. En una realización, las diferentes proteínas terapéuticas son ambas citoquinas.

40 En una realización, la proteína terapéutica está unida a la albúmina a través de un enlazador peptídico. Un péptido conector entre las porciones fusionadas puede proporcionar una mayor separación física entre las fracciones y así maximizar la accesibilidad de la porción proteica terapéutica, por ejemplo, para unirse a su receptor afín. El péptido conector puede consistir en aminoácidos de manera que sea flexible o más rígido. La secuencia enlazadora puede escindirse mediante una proteasa o químicamente.

45 Como se usa en el presente documento, el término "región Fc" se refiere a la porción de una inmunoglobulina nativa formada por los respectivos dominios Fc (o fracciones Fc) de sus dos cadenas pesadas. Como se usa en el presente documento, el término "dominio Fc" se refiere a una porción o fragmento de una única cadena pesada de inmunoglobulina (Ig) en la que el dominio Fc no comprende un dominio Fv. En determinadas realizaciones, un dominio Fc comienza en la región bisagra justo en dirección ascendente de la secuencia del sitio de escisión de papaína y termina en el terminal C del anticuerpo. De acuerdo con lo anterior, un dominio Fc completo comprende al menos un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En determinadas realizaciones, un dominio Fc comprende al menos uno de: un dominio bisagra (por ejemplo, región bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3, un dominio CH4 o una variante, porción o fragmento del mismo. En determinadas realizaciones, un dominio Fc comprende un dominio Fc completo (es decir, un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3). En determinadas realizaciones, un dominio Fc comprende un dominio bisagra (o parte del mismo) fusionado a un dominio CH3 (o parte del mismo). En determinadas realizaciones, un dominio Fc comprende un dominio CH2 (o una parte del mismo) fusionado a un dominio CH3 (o una parte del mismo). En determinadas realizaciones, un dominio Fc consta de un dominio
55

CH3 o una porción del mismo. En determinadas realizaciones, un dominio Fc consta de un dominio bisagra (o parte del mismo) y un dominio CH3 (o parte del mismo). En determinadas realizaciones, un dominio Fc consta de un dominio CH2 (o parte del mismo) y un dominio CH3. En determinadas realizaciones, un dominio Fc consta de un dominio bisagra (o parte del mismo) y un dominio CH2 (o parte del mismo). En determinadas realizaciones, un dominio Fc carece de al menos una parte de un dominio CH2 (por ejemplo, todo o parte de un dominio CH2). Un dominio Fc en el presente documento se refiere en general a un polipéptido que comprende todo o parte del dominio Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. Esto incluye, pero no se limita a, polipéptidos que comprenden los dominios CH1, bisagra, CH2 y/o CH3 completos, así como fragmentos de dichos péptidos que comprenden únicamente, por ejemplo, el dominio bisagra, CH2 y CH3. El dominio Fc puede derivarse de una inmunoglobulina de cualquier especie y/o cualquier subtipo, incluido, pero no se limita a, un anticuerpo humano IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM. El dominio Fc abarca moléculas Fc nativas y variantes de Fc. Como se establece en el presente documento, un experto en la técnica entenderá que cualquier dominio Fc puede modificarse de modo que varíe en la secuencia de aminoácidos del dominio Fc nativo de una molécula de inmunoglobulina de origen natural. En determinadas realizaciones, el dominio Fc tiene una función efectora reducida (por ejemplo, unión a FcγR).

Los dominios Fc de un polipéptido descrito en el presente documento pueden derivar de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, un dominio Fc de un polipéptido puede comprender un dominio CH2 y/o CH3 derivado de una molécula de IgG1 y una región bisagra derivada de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, un dominio Fc puede comprender una región bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, un dominio Fc puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG4.

En determinadas realizaciones, un grupo PK extendido incluye un dominio Fc o fragmentos del mismo o variantes del dominio Fc o fragmentos del mismo (todos los cuales, para los fines de la presente divulgación, están comprendidos por el término "dominio Fc"). El dominio Fc no contiene una región variable que se una al antígeno. Los dominios Fc adecuados para su uso en la presente divulgación se pueden obtener de varias fuentes diferentes. En determinadas realizaciones, un dominio Fc deriva de una inmunoglobulina humana. En determinadas realizaciones, el dominio Fc procede de una región constante de IgG1 humana. Se entiende, sin embargo, que el dominio Fc puede derivar de una inmunoglobulina de otra especie de mamífero, que incluyen, por ejemplo, un roedor (por ejemplo, un ratón, rata, conejo, cobaya) o una especie de primate no humano (por ejemplo, chimpancé, macaco).

Además, el dominio Fc (o un fragmento o variante del mismo) puede derivar de cualquier clase de inmunoglobulina, incluidas IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo de inmunoglobulina, incluidas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

Una variedad de secuencias de genes del dominio Fc (por ejemplo, secuencias de genes de región constante humana y de ratón) están disponibles en forma de depósitos de acceso público. Se pueden seleccionar dominios de región constante que comprenden una secuencia de dominio Fc que carecen de una función efectora particular y/o con una modificación particular para reducir la inmunogenicidad. Se han publicado muchas secuencias de anticuerpos y genes que codifican anticuerpos y se pueden derivar secuencias de dominio Fc adecuadas (por ejemplo, secuencias bisagra, CH2 y/o CH3, o fragmentos o variantes de las mismas) a partir de estas secuencias usando técnicas reconocidas en la técnica.

En determinadas realizaciones, el grupo PK extendido es una proteína de unión a albúmina sérica como las descritas en US2005/0287153, US2007/0003549, US2007/0178082, US2007/0269422, US2010/0113339, WO2009/083804, y WO2009/133208. En ciertas realizaciones, el grupo PK extendido es transferrina, como se describe en Estados Unidos 7,176,278 y Estados Unidos 8,158,579. En determinadas realizaciones, el grupo PK extendido es una proteína de unión a inmunoglobulina sérica como las divulgadas en US2007/0178082. En determinadas realizaciones, el grupo PK extendido es una proteína de dominio de armazón basada en fibronectina (Fn) que se une a la albúmina sérica, como las divulgadas en US2012/0094909. Los métodos para preparar proteínas de dominio de armazón basadas en fibronectina también se divulgan en US2012/0094909. Un ejemplo no limitante de un grupo PK extendido basado en Fn3 es Fn3(HSA), es decir, una proteína Fn3 que se une a la albúmina sérica humana.

En ciertos aspectos, la citoquina de PK extendida tal como IL de PK extendida, adecuada para su uso según la divulgación, puede emplear uno o más enlazadores peptídicos. Como se usa en el presente documento, el término "enlazador peptídico" se refiere a una secuencia peptídica o polipeptídica que conecta dos o más dominios (por ejemplo, la fracción PK extendida y una fracción IL tal como IL2, IL7 o IL21) en una secuencia de aminoácidos lineal de una cadena polipeptídica. Por ejemplo, se pueden usar conectores peptídicos para conectar una fracción IL2 a un dominio HSA. En otra realización, se pueden usar conectores peptídicos para conectar una fracción IL7 a un dominio HSA. En otra realización, se pueden usar conectores peptídicos para conectar una fracción IL21 a un dominio HSA.

Los enlazadores adecuados para fusionar el grupo PK extendido, por ejemplo, con IL2, IL7 o IL21, son bien conocidos en la técnica. Los enlazadores ejemplares incluyen enlazadores polipeptídicos de glicina-serina,

enlazadores polipeptídicos de glicina-prolina y enlazadores polipeptídicos de prolina-alanina. En determinadas realizaciones, el enlazador es un enlazador polipéptido de glicina-serina, es decir, un péptido que consta de residuos de glicina y serina.

Antígeno

5 Los antígenos peptídicos y proteicos adecuados para su uso de acuerdo con la divulgación, es decir, el antígeno o variante del mismo, normalmente incluyen un péptido o proteína que comprende un epítipo para inducir una respuesta inmunitaria. El péptido, proteína o epítipo puede derivar de un antígeno diana, es decir, el antígeno contra el cual se va a provocar una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, el antígeno peptídico o proteico o el epítipo contenido dentro del antígeno peptídico o proteico puede ser un antígeno diana o un fragmento o
10 variante de un antígeno diana.

Un antígeno peptídico y proteico que se administra o que está codificado por el ácido nucleico, en particular el ARN que se administra, es decir, un antígeno de vacuna, preferentemente da como resultado la estimulación, cebado y/o expansión de células T genéticamente modificadas para expresar un CAR en el sujeto se le
15 administra el péptido o antígeno proteico o ácido nucleico. Dichas células T estimuladas, cebadas y/o expandidas se dirigen preferiblemente contra un antígeno diana, en particular un antígeno diana expresado por células, tejidos y/u órganos enfermos, es decir, un antígeno asociado a una enfermedad. Por tanto, un antígeno de vacuna puede comprender el antígeno asociado a la enfermedad, o un fragmento o variante del mismo. En una realización, dicho fragmento o variante es inmunológicamente equivalente al antígeno asociado a la enfermedad. En el contexto de la presente divulgación, el término "fragmento de un antígeno" o "variante de un
20 antígeno" se refiere a un agente que resulta en la estimulación, activación y/o expansión de células T diseñadas con CAR, las cuales, una vez estimuladas, activadas y/o expandidas, tienen como objetivo el antígeno, es decir, un antígeno asociado a la enfermedad, en particular cuando es presentado por células, tejidos y/u órganos enfermos. Por lo tanto, el antígeno de la vacuna puede corresponder o puede comprender el antígeno asociado a la enfermedad, puede corresponder o puede comprender un fragmento del antígeno asociado a la enfermedad o puede corresponder o puede comprender un antígeno que es homólogo al antígeno asociado a la enfermedad o un fragmento del mismo. Si el antígeno de la vacuna comprende un fragmento del antígeno asociado a la enfermedad o una secuencia de aminoácidos que es homóloga a un fragmento del antígeno asociado a la enfermedad, dicho fragmento o secuencia de aminoácidos puede comprender un epítipo del antígeno asociado a la enfermedad al que se asocia el CAR de las células T modificadas con CAR o una
30 secuencia que es homóloga a un epítipo del antígeno asociado a la enfermedad. Por tanto, de acuerdo con la divulgación, un antígeno de vacuna puede comprender un fragmento inmunogénico de un antígeno asociado a una enfermedad o una secuencia de aminoácidos que sea homóloga a un fragmento inmunogénico de un antígeno asociado a una enfermedad. Un "fragmento inmunogénico de un antígeno" de acuerdo con la divulgación se refiere preferiblemente a un fragmento de un antígeno que es capaz de estimular, cebar y/o expandir células T que portan una unión de CAR al antígeno o células que expresan el antígeno. Se prefiere que el antígeno de la vacuna (similar al antígeno asociado a la enfermedad) pueda expresarse en la superficie de una célula tal como una célula presentadora de antígeno para proporcionar el epítipo relevante para la unión mediante células T diseñadas con CAR. El antígeno de la vacuna puede ser un antígeno recombinante.

El término "inmunológicamente equivalente" significa que la molécula inmunológicamente equivalente tal como la secuencia de aminoácidos inmunológicamente equivalente exhibe las mismas o esencialmente las mismas propiedades inmunológicas y/o ejerce los mismos o esencialmente los mismos efectos inmunológicos, por ejemplo, con respecto al tipo de el efecto inmunológico. En el contexto de la presente divulgación, el término "inmunológicamente equivalente" se usa preferiblemente con respecto a los efectos o propiedades inmunológicas de los antígenos o variantes de antígenos usados para la inmunización. Por ejemplo, una
45 secuencia de aminoácidos es inmunológicamente equivalente a una secuencia de aminoácidos de referencia si dicha secuencia de aminoácidos cuando se expone al sistema inmunitario de un sujeto tal como células T que se unen a la secuencia de aminoácidos de referencia o células que expresan la secuencia de aminoácidos de referencia induce una reacción inmune que tiene la especificidad de reaccionar con la secuencia de aminoácidos de referencia. Por lo tanto, una molécula que es inmunológicamente equivalente a un antígeno exhibe las mismas o esencialmente las mismas propiedades y/o ejerce los mismos o esencialmente los mismos efectos con respecto a la estimulación, cebado y/o expansión de células T que el antígeno al que se dirigen las células T son el objetivo.

El término "cebado" se refiere a un proceso en el que una célula T tiene su primer contacto con su antígeno específico y provoca la diferenciación en células T efectoras.

55 El término "expansión clonal" o "expansión" se refiere a un proceso en el que se multiplica una entidad específica. En el contexto de la presente divulgación, el término se usa preferiblemente en el contexto de una respuesta inmunológica en la que los linfocitos son estimulados por un antígeno, proliferan y el linfocito específico que reconoce dicho antígeno se amplifica. Preferiblemente, la expansión clonal conduce a la diferenciación de los linfocitos.

El término “antígeno” se refiere a un agente que comprende un epítipo contra el cual se puede generar una respuesta inmunitaria. El término “antígeno” incluye, en particular, proteínas y péptidos. En una realización, un antígeno está presente en la superficie de células del sistema inmunitario tales como células presentadoras de antígeno como células dendríticas o macrófagos. En una realización, un antígeno o un producto de procesamiento del mismo, como un epítipo de célula T, está unido por una molécula de CAR. De acuerdo con lo anterior, un antígeno o un producto de procesamiento del mismo puede reaccionar específicamente con linfocitos T (células T). En una realización, un antígeno es un antígeno asociado a una enfermedad, tal como un antígeno tumoral, un antígeno viral o un antígeno bacteriano y un epítipo deriva de dicho antígeno.

El término “antígeno asociado a una enfermedad” se utiliza en su sentido más amplio para referirse a cualquier antígeno asociado a una enfermedad. Un antígeno asociado a una enfermedad es una molécula que contiene epítopos que estimularán el sistema inmunitario del huésped para generar una respuesta inmunitaria específica del antígeno celular y/o una respuesta de anticuerpos humorales contra la enfermedad. Por lo tanto, el antígeno asociado a la enfermedad o un epítipo del mismo puede usarse con fines terapéuticos. Los antígenos asociados a enfermedades pueden estar asociados con infección por microbios, típicamente antígenos microbianos, o asociados con cáncer, típicamente tumores.

El término “antígeno tumoral” se refiere a un constituyente de las células cancerosas que puede derivar del citoplasma, la superficie celular y el núcleo celular. En particular se refiere a aquellos antígenos que se producen intracelularmente o como antígenos de superficie en células tumorales. Un antígeno tumoral normalmente se expresa preferentemente en células cancerosas (por ejemplo, se expresa en niveles más altos en células cancerosas que en células no cancerosas) y en algunos casos se expresa únicamente en células cancerosas. Ejemplos de antígenos tumorales incluyen, sin limitación, p53, ART-4, BAGE, beta-catenina/m, Bcr-abL, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, las proteínas de la superficie celular de la familia de las claudinas, tales como CLAUDIN-6, CLAUDIN-18.2 y CLAUDIN-12, c-MYC, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gap 100, HAGE, HER-2/neu, HPV-E7, HPV-E6, HAST-2, hTERT (o hTRT), LAGE, LDLR/FUT, MAGE-A, preferiblemente MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A 10, MAGE-A 11 o MAGE-A12, MAGE-B, MAGE-C, MART-1/Melan-A, MC1R, miosina/m, MUC1, MUM-1, MUM -2, MUM -3, NA88-A, NF1, NY-ESO-1, NY-BR-1, p190 menor BCR-abL, Pml/RARa, PRAME, proteinasa 3, PSA, PSM, RAGE, RU1 o RU2, SAGE, SART-1 o SART-3, SCGB3A2, SCP1, SCP2, SCP3, SSX, SURVIVIN, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, TPTE, WT y WT-1.

El término “antígeno viral” se refiere a cualquier componente viral que tenga propiedades antigénicas, es decir, que pueda provocar una respuesta inmunitaria en un individuo. El antígeno viral puede ser una ribonucleoproteína viral o una proteína de la envoltura.

El término “antígeno bacteriano” se refiere a cualquier componente bacteriano que tenga propiedades antigénicas, es decir, que pueda provocar una respuesta inmunitaria en un individuo. El antígeno bacteriano puede derivar de la pared celular o de la membrana citoplasmática de la bacteria.

El término “epítipo” se refiere a una parte o fragmento de una molécula tal como un antígeno que es reconocido por el sistema inmunitario. Por ejemplo, el epítipo puede ser reconocido por células T, células B o anticuerpos. Un epítipo de un antígeno puede incluir una porción continua o discontinua del antígeno y puede estar entre aproximadamente 5 y aproximadamente 100, tal como entre aproximadamente 5 y aproximadamente 50, más preferiblemente entre aproximadamente 8 y aproximadamente 30, lo más preferiblemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, por ejemplo, el epítipo puede tener preferiblemente 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos en longitud. En una realización, un epítipo tiene una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 25 aminoácidos. El término “epítipo” incluye epítopos de células T.

El término “epítipo de célula T” se refiere a una parte o fragmento de una proteína que es reconocida por una célula T cuando se presenta en el contexto de moléculas de MHC. El término “complejo mayor de histocompatibilidad” y la abreviatura “MHC” incluyen moléculas MHC de clase I y MHC de clase II y se refieren a un complejo de genes que está presente en todos los vertebrados. Las proteínas o moléculas del MHC son importantes para la señalización entre linfocitos y células presentadoras de antígenos o células enfermas en reacciones inmunes, en las que las proteínas o moléculas del MHC se unen a epítopos peptídicos y los presentan para su reconocimiento por los receptores de células T en las células T. Las proteínas codificadas por el MHC se expresan en la superficie de las células y muestran tanto antígenos propios (fragmentos peptídicos de la propia célula) como antígenos no propios (por ejemplo, fragmentos de microorganismos invasores) en una célula T. En el caso de complejos MHC/péptido de clase I, los péptidos de unión tienen típicamente una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 aminoácidos, aunque pueden ser eficaces péptidos más largos o más cortos. En el caso de complejos MHC/péptido de clase II, los péptidos de unión tienen típicamente una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 aminoácidos y, en particular, tienen una longitud de aproximadamente 13 a aproximadamente 18 aminoácidos, mientras que los péptidos más largos y más cortos pueden ser eficaces.

En una realización, el antígeno diana es un antígeno tumoral y el antígeno de la vacuna o un fragmento del mismo (por ejemplo, un epítipo) deriva del antígeno tumoral. El antígeno tumoral puede ser un antígeno “estándar”, que generalmente se sabe que se expresa en diversos cánceres. El antígeno tumoral también puede ser un “neoantígeno”, que es específico del tumor de un individuo y no ha sido reconocido previamente por el sistema inmunitario. Un neoantígeno o neopítipo puede resultar de una o más mutaciones específicas del cáncer en el genoma de las células cancerosas que dan lugar a cambios de aminoácidos. Si el antígeno tumoral es un neoantígeno, el antígeno de la vacuna comprende preferiblemente un epítipo o un fragmento de dicho neoantígeno que comprende uno o más cambios de aminoácidos.

El antígeno peptídico y proteico puede tener de 2 a 100 aminoácidos, incluyendo, por ejemplo, 5 aminoácidos, 10 aminoácidos, 15 aminoácidos, 20 aminoácidos, 25 aminoácidos, 30 aminoácidos, 35 aminoácidos, 40 aminoácidos, 45 aminoácidos, o 50 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, un péptido puede tener más de 50 aminoácidos. En algunas realizaciones, el péptido puede tener más de 100 aminoácidos.

De acuerdo con la divulgación, el antígeno o variante del mismo debería ser reconocible por un CAR. Preferiblemente, el antígeno o variante del mismo, si es reconocido por un CAR, es capaz de inducir, en presencia de señales coestimuladoras apropiadas, estimulación, cebado y/o expansión de la célula T que porta el CAR que reconoce el antígeno o variante del mismo. En el contexto de las realizaciones de la presente divulgación, el antígeno o variante del mismo está presente preferiblemente en la superficie de una célula, preferiblemente una célula presentadora de antígeno. El reconocimiento del antígeno en la superficie de una célula enferma puede dar lugar a una reacción inmune contra el antígeno (o la célula que expresa el antígeno).

De acuerdo con los diversos aspectos de la divulgación, el objetivo es preferiblemente proporcionar una respuesta inmunitaria contra células cancerosas que expresan un antígeno tumoral como CLDN6 o CLDN18.2 y tratar una enfermedad cancerosa que involucra células que expresan un antígeno tumoral como CLDN6 o CLDN18.2. Preferiblemente, la divulgación implica la administración de células T diseñadas con CAR dirigidas contra células cancerosas que expresan un antígeno tumoral como CLDN6 o CLDN18.2.

“Superficie celular” se utiliza de acuerdo con su significado normal en la técnica y, por tanto, incluye el exterior de la célula que es accesible a la unión mediante proteínas y otras moléculas. Un antígeno se expresa en la superficie de las células si está ubicado en la superficie de dichas células y es accesible para unirse, por ejemplo, mediante anticuerpos específicos de antígeno añadidos a las células. En una realización, un antígeno expresado en la superficie de las células es una proteína de membrana integral que tiene una porción extracelular reconocida por un CAR.

El término “porción extracelular” o “exodominio” en el contexto de la presente divulgación se refiere a una parte de una molécula tal como una proteína que está frente al espacio extracelular de una célula y preferiblemente es accesible desde el exterior de dicha célula, por ejemplo, uniendo moléculas como anticuerpos ubicados fuera de la célula. Preferiblemente, el término se refiere a uno o más bucles o dominios extracelulares o un fragmento de los mismos.

En una realización de todos los aspectos de la divulgación, un antígeno se expresa en una célula enferma tal como una célula cancerosa. En una realización, un antígeno se expresa en la superficie de una célula enferma tal como una célula cancerosa. En una realización, un CAR se une a un dominio extracelular o a un epítipo en un dominio extracelular de un antígeno o una variante del mismo. En una realización, un CAR se une a epítopos nativos de un antígeno o una variante del mismo presente en la superficie de células vivas. En una realización, dicho antígeno es una claudina, en particular claudina 6 o claudina 18.2, y dicho CAR se une al primer bucle extracelular de dicha claudina. En una realización, la unión de dicho CAR cuando se expresa por células T y/o está presente en células T a un antígeno o una variante del mismo presente en células tales como células presentadoras de antígeno da como resultado la estimulación, cebado y/o expansión de dichas células T. En una realización, la unión de dicho CAR cuando se expresa por células T y/o está presente en células T a un antígeno presente en células enfermas tales como células cancerosas da como resultado la citólisis y/o apoptosis de las células enfermas, en la que dichas células T liberan preferiblemente factores de células citotóxicas, por ejemplo, perforinas y granzimas.

Inhibidores de puntos de control inmunitario

En determinadas realizaciones, los inhibidores de puntos de control inmunitarios se usan en combinación con otros agentes terapéuticos descritos en el presente documento.

Como se utiliza en el presente documento, “punto de control inmunitario” se refiere a señales coestimuladoras e inhibitoras que regulan la amplitud y calidad del reconocimiento de un antígeno por parte del receptor de células T. En determinadas realizaciones, el punto de control inmunitario es una señal inhibitora. En determinadas realizaciones, la señal inhibitora es la interacción entre PD-1 y PD-L1. En determinadas realizaciones, la señal inhibitora es la interacción entre CTLA-4 y CD80 o CD86 para desplazar la unión de CD28. En determinadas realizaciones, la señal inhibitora es la interacción entre moléculas LAG3 y MHC de clase II. En determinadas realizaciones, la señal inhibitora es la interacción entre TIM3 y galectina 9.

Como se usa en el presente documento, "inhibidor de puntos de control inmunitario" se refiere a una molécula que reduce, inhibe, interfiere o modula total o parcialmente una o más proteínas de puntos de control. En determinadas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario previene las señales inhibitoras asociadas con el punto de control inmunitario. En determinadas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo, o fragmento del mismo, que altera la señalización inhibitora asociada con el punto de control inmunitario. En determinadas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es una molécula pequeña que altera la señalización inhibitora. En determinadas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo, fragmento del mismo o imitador de anticuerpo, que previene la interacción entre proteínas bloqueantes del punto de control, por ejemplo, un anticuerpo, o fragmento del mismo, que previene la interacción entre PD-1 y PD-L1. En determinadas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo, o fragmento del mismo, que previene la interacción entre CTLA-4 y CD80 o CD86. En determinadas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo, o fragmento del mismo, que previene la interacción entre LAG3 y sus ligandos, o TIM-3 y sus ligandos. El inhibidor del punto de control también puede estar en la forma soluble de las propias moléculas (o variantes de las mismas), por ejemplo, una fusión PD-L1 o PD-L1 soluble.

El receptor "Muerte Programada-1 (PD-1)" se refiere a un receptor inmunoinhibidor que pertenece a la familia CD28. PD-1 se expresa predominantemente en células T previamente activadas en vivo, y se une a dos ligandos, PD-L1 y PD-L2. El término "PD-1", tal como se utiliza en el presente documento, incluye PD-1 humano (hPD-1), variantes, isoformas y homólogos de especies de hPD-1, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hPD-1.

El "ligando de muerte programada-1 (PD-L1)" es uno de los dos ligandos de glicoproteína de la superficie celular para PD-1 (el otro es PD-L2) que regula negativamente la activación de las células T y la secreción de citoquinas al unirse a PD-1. El término "PD-L1" como se usa en el presente documento incluye PD-L1 humano (hPD-L1), variantes, isoformas y especies homólogas de hPD-L1 y análogos que tienen al menos un epítipo común con hPD-L1.

El "antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4)" es una molécula de superficie de células T y es miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas. Esta proteína regula negativamente el sistema inmunitario uniéndose a CD80 y CD86. El término "CTLA-4" como se usa en el presente documento incluye CTLA-4 humano (hCTLA-4), variantes, isoformas y especies homólogas de hCTLA-4, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hCTLA-4.

El "Gen de activación de linfocitos 3 (LAG3)" es un receptor inhibidor asociado con la inhibición de la actividad de los linfocitos mediante la unión a moléculas del MHC de clase II. Este receptor mejora la función de las células Treg e inhibe la función de las células T efectoras CD8+. El término "LAG3" como se usa en el presente documento incluye LAG3 humano (hLAG3), variantes, isoformas y especies homólogas de hLAG3 y análogos que tienen al menos un epítipo común.

La "Proteína 3 de membrana de células T (TIM3)" es un receptor inhibidor implicado en la inhibición de la actividad de los linfocitos mediante la inhibición de las respuestas de las células TH1. Su ligando es la galectina 9, que está regulada positivamente en varios tipos de cánceres. El término "TIM3" como se usa en el presente documento incluye TIM3 humano (hTIM3), variantes, isoformas y especies homólogas de hTIM3 y análogos que tienen al menos un epítipo común.

La "familia B7" se refiere a ligandos inhibidores con receptores indefinidos. La familia B7 abarca B7-H3 y B7-H4, ambos regulados positivamente en las células tumorales y en las células infiltrantes de tumores.

En determinadas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario adecuado para su uso en los métodos divulgados en el presente documento es un antagonista de señales inhibitoras, por ejemplo, un anticuerpo que se dirige, por ejemplo, a PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, B7- H3, B7-H4 o TIM3. Estos ligandos y receptores se revisan en Pardoll, D., Nature. 12: 252-264, 2012.

En determinadas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, que altera o inhibe la señalización de un inmunorregulador inhibidor. En determinadas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es una molécula pequeña que altera o inhibe la señalización de un inmunorregulador inhibidor.

En determinadas realizaciones, el inmunorregulador inhibidor es un componente de la vía de señalización PD-1/PD-L1. Por consiguiente, ciertas realizaciones de la divulgación proporcionan la administración a un sujeto de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que interrumpe la interacción entre el receptor PD-1 y su ligando, PD-L1. Se conocen en la técnica anticuerpos que se unen a PD-1 e interrumpen la interacción entre PD-1 y su ligando, PD-L1. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o su porción de unión a antígeno se une específicamente a PD-1. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o su porción de unión a antígeno se une específicamente a PD-L1 e inhibe su interacción con PD-1, aumentando así la actividad inmunitaria.

En determinadas realizaciones, el inmunorregulador inhibidor es un componente de la vía de señalización de CTLA4. De acuerdo con lo anterior, ciertas realizaciones de la divulgación proporcionan la administración a un sujeto de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se dirige a CTLA4 e interrumpe su interacción con CD80 y CD86.

- 5 En determinadas realizaciones, el inmunorregulador inhibidor es un componente de la vía de señalización LAG3 (gen 3 de activación de linfocitos). De acuerdo con lo anterior, ciertas realizaciones de la divulgación proporcionan la administración a un sujeto de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se dirige a LAG3 e interrumpe su interacción con moléculas de MHC de clase II.

- 10 En determinadas realizaciones, el inmunorregulador inhibidor es un componente de la vía de señalización de la familia B7. En determinadas realizaciones, los miembros de la familia B7 son B7-H3 y B7-H4. De acuerdo con lo anterior, ciertas realizaciones de la divulgación proporcionan la administración a un sujeto de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se dirige a B7-H3 o H4. La familia B7 no tiene receptores definidos, pero estos ligandos están regulados positivamente en las células tumorales o en las células infiltrantes de tumores. Los modelos preclínicos en ratones han demostrado que el bloqueo de estos
15 ligandos puede mejorar la inmunidad antitumoral.

En determinadas realizaciones, el inmunorregulador inhibidor es un componente de la vía de señalización TIM3 (proteína 3 de membrana de células T). De acuerdo con lo anterior, ciertas realizaciones de la divulgación proporcionan la administración a un sujeto de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se dirige a TIM3 e interrumpe su interacción con galectina 9.

- 20 Un experto en la técnica entenderá que otros objetivos de puntos de control inmunitarios también pueden ser dirigidos por antagonistas o anticuerpos, siempre que el direccionamiento dé como resultado la estimulación de una respuesta inmunitaria tal como una respuesta inmunitaria antitumoral como se refleja en, por ejemplo, un aumento en la proliferación de células T, una mayor activación de las células T y/o una mayor producción de citoquinas (por ejemplo, IFN- γ , IL2).

- 25 De acuerdo con la divulgación, el término "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos quiméricos. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada.
30 Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de cadena ligera. Las regiones VH y VL se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesto por tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente
35 orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, incluidas varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

- 40 Los anticuerpos pueden derivarse de diferentes especies, incluidas, pero no se limita a, ratón, rata, conejo, cobaya y ser humano.

- Los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen anticuerpos IgA tales como IgA1 o IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM e IgD. En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, más particularmente un isotipo IgG1, kappa o IgG1, lambda (es decir, IgG1, κ , A), un anticuerpo IgG2a (por ejemplo, IgG2a, κ , λ), un anticuerpo IgG2b (por ejemplo, IgG2b, κ , λ), un anticuerpo IgG3 (por ejemplo, IgG3, κ , λ) o un anticuerpo IgG4 (por ejemplo, IgG4, κ , λ).
45

- Los términos "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de unión") o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "fragmento de unión") o términos similares se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno.
50 Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión comprendidos dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en los dominios VL, VH, CL y CH; (ii) F(ab')₂ fragmentos, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que consisten en los dominios VH y CH; (iv) fragmentos Fv que consisten en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo,
55 (v) fragmentos dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que constan de un dominio VH; (vi) regiones determinantes de complementariedad (CDR) aisladas, y (vii) combinaciones de dos o más CDR aisladas que pueden estar opcionalmente unidas mediante un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos

recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una única cadena proteica en la que VL y las regiones VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); ver, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). También se pretende que tales anticuerpos de cadena sencilla estén incluidos dentro del término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Un ejemplo adicional son las proteínas de fusión de inmunoglobulinas con dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido del dominio de unión que está fusionado a un polipéptido de la región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región bisagra, y (iii) una región constante CH3 de cadena pesada fusionada a la región constante CH2. El polipéptido del dominio de unión puede ser una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera. Las proteínas de fusión de inmunoglobulinas con dominio de unión se divulgan además US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se analizan para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Orientación al ARN

De acuerdo con la divulgación, después de la administración del ARN descrito en el presente documento, al menos una porción del ARN se entrega a una célula diana. En una realización, al menos una porción del ARN se entrega al citosol de la célula diana. En una realización, la célula diana traduce el ARN para producir el péptido o proteína codificado.

Algunos aspectos de la divulgación implican la administración dirigida del ARN divulgado en el presente documento (por ejemplo, ARN que codifica una citoquina y ARN que codifica un antígeno o una variante del mismo).

En una realización, la divulgación implica dirigirse al sistema linfático, en particular a órganos linfoides secundarios, más específicamente al bazo. Se prefiere en particular dirigirse al sistema linfático, en particular a los órganos linfoides secundarios, más específicamente al bazo, si el ARN administrado es un ARN que codifica un antígeno o una variante del mismo.

En una realización, la célula diana es una célula del bazo. En una realización, la célula diana es una célula presentadora de antígeno tal como una célula presentadora de antígeno profesional en el bazo. En una realización, la célula diana es una célula dendrítica del bazo.

El "sistema linfático" es parte del sistema circulatorio y una parte importante del sistema inmunitario, y comprende una red de vasos linfáticos que transportan linfa. El sistema linfático consta de órganos linfáticos, una red conductora de vasos linfáticos y la linfa circulante. Los órganos linfoides primarios o centrales generan linfocitos a partir de células progenitoras inmaduras. El timo y la médula ósea constituyen los órganos linfoides primarios. Los órganos linfoides secundarios o periféricos, que incluyen los ganglios linfáticos y el bazo, mantienen los linfocitos vírgenes maduros e inician una respuesta inmunitaria adaptativa.

El ARN puede administrarse al bazo mediante las denominadas formulaciones lipoplex, en las que el ARN está unido a liposomas que comprenden un lípido catiónico y opcionalmente un lípido adicional o auxiliar para formar formulaciones de nanopartículas inyectables. Los liposomas se pueden obtener inyectando una solución de lípidos en etanol en agua o en una fase acuosa adecuada. Las partículas de ARN lipoplex se pueden preparar al mezclar los liposomas con ARN. El bazo que se dirige a las partículas de ARN lipoplex se describe en WO 2013/143683. Se ha descubierto que las partículas de ARN lipoplex que tienen una carga neta negativa pueden usarse para dirigirse preferentemente al tejido del bazo o a las células del bazo tales como las células presentadoras de antígenos, en particular las células dendríticas. De acuerdo con lo anterior, tras la administración de las partículas de ARN lipoplex, se produce una acumulación de ARN y/o expresión de ARN en el bazo. Por tanto, las partículas de ARN lipoplex de la divulgación se pueden usar para expresar ARN en el bazo. En una realización, después de la administración de las partículas de ARN lipoplex, no se produce ninguna o esencialmente ninguna acumulación de ARN y/o expresión de ARN en el pulmón y/o el hígado. En una realización, después de la administración de las partículas de ARN lipoplex, se produce acumulación de ARN y/o expresión de ARN en células presentadoras de antígenos, tales como células presentadoras de antígenos profesionales en el bazo. Por lo tanto, las partículas de ARN lipoplex de la divulgación se pueden usar para expresar ARN en dichas células presentadoras de antígenos. En una realización, las células presentadoras de antígenos son células dendríticas y/o macrófagos.

En el contexto de la presente divulgación, el término "partícula lipoplex de ARN" se refiere a una partícula que contiene lípidos, en particular lípidos catiónicos, y ARN. Las interacciones electrostáticas entre liposomas cargados positivamente y ARN cargados negativamente dan como resultado la complejación y la formación espontánea de partículas de ARN lipoplex. Los liposomas cargados positivamente pueden sintetizarse generalmente usando un lípido catiónico, como DOTMA, y lípidos adicionales, como DOPE. En una realización, una partícula de ARN lipoplex es una nanopartícula.

Como se usa en el presente documento, un "lípidio catiónico" se refiere a un lípidio que tiene una carga neta positiva. Los lípidos catiónicos se unen al ARN cargado negativamente mediante interacción electrostática con la matriz lipídica. Generalmente, los lípidos catiónicos poseen una fracción lipófila, como un esteroil, una cadena acilo o diacilo, y el grupo principal del lípidio normalmente lleva la carga positiva. Los ejemplos de lípidos catiónicos incluyen, pero no se limitan a, 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA), dimetildioctadecilamonio (DDAB); propano 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio (DOTAP); 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP); propanos de 1,2-diaciloxi-3-dimetilamonio; propanos de 1,2-dialquiloxi-3-dimetilamonio; cloruro de dioctadecil-dimetilamonio (DODAC), 2,3-di(tetradecoxi)propil-(2-hidroxi-etil)-dimetilazano (DMRIE), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DMEPC), 1,2-dimiristoil-3-trimetilamonio propano (DMTAP), bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetil-hidroxi-etilamonio (DORIE) y 2,3-dioleiloxi-N-[2(esperminacarboxamida)etil]-N,N-dimetil-Trifluoroacetato de i-propanamio (DOSPA). Los preferidos son DOTMA, DOTAP, DODAC y DOSPA. En realizaciones específicas, el lípidio catiónico es DOTMA y/o DOTAP.

Se puede incorporar un lípidio adicional para ajustar la relación general de carga positiva a negativa y la estabilidad física de las partículas de ARN lipoplex. En determinadas realizaciones, el lípidio adicional es un lípidio neutro. Como se usa en el presente documento, un "lípidio neutro" se refiere a un lípidio que tiene una carga neta de cero. Los ejemplos de lípidos neutros incluyen, entre otros, 1,2-di-(9Z-octadecenil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomielina, cefalina, colesterol y cerebrósido. En realizaciones específicas, el lípidio adicional es DOPE, colesterol y/o DOPC.

En determinadas realizaciones, las partículas de ARN lipoplex incluyen tanto un lípidio catiónico como un lípidio adicional. En una realización ejemplar, el lípidio catiónico es DOTMA y el lípidio adicional es DOPE.

En algunas realizaciones, la relación molar del al menos un lípidio catiónico al menos un lípidio adicional es de aproximadamente 10:0 a aproximadamente 1:9, aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:2, o aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:1. En realizaciones específicas, la relación molar puede ser aproximadamente 3:1, aproximadamente 2.75:1, aproximadamente 2.5:1, aproximadamente 2.25:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 1.75:1, aproximadamente 1.5:1, aproximadamente 1.25:1 o aproximadamente 1:1. En una realización ejemplar, la relación molar del al menos un lípidio catiónico a al menos un lípidio adicional es aproximadamente 2:1.

Las partículas de ARN lipoplex descritas en el presente documento tienen un diámetro promedio que en una realización varía de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 1000 nm, de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 250 a aproximadamente 700 nm, de aproximadamente 400 a aproximadamente 600 nm, de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 500 nm, o desde aproximadamente 350 nm a aproximadamente 400 nm. En realizaciones específicas, las partículas de ARN lipoplex tienen un diámetro promedio de aproximadamente 200 nm, aproximadamente 225 nm, aproximadamente 250 nm, aproximadamente 275 nm, aproximadamente 300 nm, aproximadamente 325 nm, aproximadamente 350 nm, aproximadamente 375 nm, aproximadamente 400 nm, aproximadamente 425 nm, aproximadamente 450 nm, aproximadamente 475 nm, aproximadamente 500 nm, aproximadamente 525 nm, aproximadamente 550 nm, aproximadamente 575 nm, aproximadamente 600 nm, aproximadamente 625 nm, aproximadamente 650 nm, aproximadamente 700 nm, aproximadamente 725 nm, aproximadamente 750 nm, aproximadamente 775 nm, aproximadamente 800 nm, aproximadamente 825 nm, aproximadamente 850 nm, aproximadamente 875 nm, aproximadamente 900 nm, aproximadamente 925 nm, aproximadamente 950 nm, aproximadamente 975 nm o aproximadamente 1000 nm. En una realización, las partículas de ARN lipoplex tienen un diámetro promedio que oscila entre aproximadamente 250 nm y aproximadamente 700 nm. En otra realización, las partículas de ARN lipoplex tienen un diámetro promedio que oscila entre aproximadamente 300 nm y aproximadamente 500 nm. En una realización ejemplar, las partículas de ARN lipoplex tienen un diámetro promedio de aproximadamente 400 nm.

La carga eléctrica de las partículas de ARN lipoplex de la presente divulgación es la suma de las cargas eléctricas presentes en al menos un lípidio catiónico y las cargas eléctricas presentes en el ARN. La relación de carga es la relación entre las cargas positivas presentes en al menos un lípidio catiónico y las cargas negativas presentes en el ARN. La relación de carga de las cargas positivas presentes en al menos un lípidio catiónico a las cargas negativas presentes en el ARN se calcula mediante la siguiente ecuación: relación de carga = [(concentración de lípidio catiónico (mol)) * (el número total de cargas positivas en el lípidio catiónico)] / [(concentración de ARN (mol)) * (el número total de cargas negativas en el ARN)].

Las partículas de lipoplex de ARN dirigidas al bazo descritas en el presente documento a pH fisiológico tienen preferiblemente una carga negativa neta tal como una relación de carga de cargas positivas a cargas negativas de aproximadamente 1.9:2 a aproximadamente 1:2. En realizaciones específicas, la relación de carga de cargas positivas a cargas negativas en las partículas de lipoplex de ARN a pH fisiológico es aproximadamente 1.9:2.0, aproximadamente 1.8:2.0, aproximadamente 1.7:2.0, aproximadamente 1.6:2.0, aproximadamente 1.5:2.0, aproximadamente 1.4:2.0, aproximadamente 1.3:2.0, aproximadamente 1.2:2.0, aproximadamente 1.1:2.0 o aproximadamente 1:2.0.

Las citoquinas tales como citoquinas de PK extendida, en particular interleucinas de PK extendida, tales como las descritas en el presente documento, pueden administrarse a un órgano diana o tejido diana en un sujeto que comprende administrar al sujeto ARN que codifica una citoquina en una formulación para la entrega preferencial de ARN a dicho órgano o tejido diana.

5 En una realización, el órgano diana es el sistema linfático, en particular órganos linfoides secundarios, más específicamente el bazo, y el tejido diana es tejido del sistema linfático, en particular tejido de órganos linfoides secundarios, más específicamente tejido del bazo. Se prefiere la administración de una citoquina a dicho tejido diana, en particular, si se desea la presencia de la citoquina en este órgano o tejido (por ejemplo, para inducir una respuesta inmunitaria, en particular en caso de que se requieran citoquinas durante el cebado de células T o para la activación) de células inmunitarias residentes), aunque no se desea que la citoquina esté presente sistémicamente, en particular en cantidades significativas (por ejemplo, porque la citoquina tiene toxicidad sistémica). Ejemplos particularmente preferidos de citoquinas adecuadas son las citoquinas implicadas en el cebado de células T.

10
15 En otra realización de administración de una citoquina a un órgano diana o tejido diana en un sujeto, el órgano diana es el hígado y el tejido diana es tejido hepático. Se prefiere la administración de una citoquina a dicho tejido diana, en particular, si se desea la presencia de la citoquina en este órgano o tejido y/o si se desea expresar grandes cantidades de la citoquina y/o si la presencia sistémica de la citoquina Se desea o se requiere, en particular en cantidades significativas.

20 En una realización, el ARN que codifica una citoquina se administra en una formulación dirigida al hígado. Tales formulaciones se describen en el presente documento. Ejemplos de citoquinas adecuadas incluyen IL2, IL7 o IL21, fragmentos y variantes de las mismas, y proteínas de fusión de estas citoquinas, fragmentos y variantes, tales como citoquinas de PK extendida, como las descritas en el presente documento. Ejemplos particularmente preferidos de citoquinas adecuadas son citoquinas implicadas en la proliferación y/o mantenimiento de células T.

25 Los sistemas de administración de ARN tienen una preferencia inherente al hígado. Esto se aplica a partículas lipídicas, nanopartículas catiónicas y neutras, en particular nanopartículas lipídicas como liposomas, nanomicelas y ligandos lipófilos en bioconjugados. La acumulación hepática es causada por la naturaleza discontinua de la vasculatura hepática o del metabolismo de los lípidos (liposomas y conjugados de lípidos o colesterol).

30 Para administración in vivo de ARN al hígado, se puede utilizar un sistema de administración de fármacos para transportar el ARN al hígado evitando su degradación. Por ejemplo, las nanomicelas políplex que consisten en una superficie recubierta de polietilenglicol (PEG) y un núcleo que contiene ARNm son un sistema útil porque las nanomicelas proporcionan excelente estabilidad del ARN in vivo, en condiciones fisiológicas. Además, la propiedad de sigilo proporcionada por la superficie de nanomicelas políplex, compuesta de densas empalizadas de PEG, evade eficazmente las defensas inmunes del huésped.

Composiciones farmacéuticas

Los agentes descritos en el presente documento se pueden administrar en composiciones farmacéuticas o medicamentos y se pueden administrar en forma de cualquier composición farmacéutica adecuada.

40 En una realización de todos los aspectos de la divulgación, los componentes descritos en el presente documento, tales como células T modificadas genéticamente para expresar un CAR, ácido nucleico que codifica una citoquina o ácido nucleico que codifica un antígeno o una variante de los mismos, ya sea juntos o separados entre sí, se pueden administrar en una composición farmacéutica que puede comprender un portador farmacéuticamente aceptable y puede comprender opcionalmente uno o más adyuvantes, estabilizadores, etc. En una realización, la composición farmacéutica es para tratamientos terapéuticos o profilácticos, por ejemplo, para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad que implica un antígeno tal como una enfermedad cancerosa como las descritas en el presente documento.

45 El término "composición farmacéutica" se refiere a una formulación que comprende un agente terapéuticamente eficaz, preferiblemente junto con portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Dicha composición farmacéutica es útil para tratar, prevenir o reducir la gravedad de una enfermedad o trastorno mediante la administración de dicha composición farmacéutica a un sujeto. Una composición farmacéutica también se conoce en la técnica como formulación farmacéutica.

50 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación comprenden preferiblemente uno o más adyuvantes o pueden administrarse con uno o más adyuvantes. El término "adyuvante" se refiere a un compuesto que prolonga, mejora o acelera una respuesta inmunitaria. Los adyuvantes comprenden un grupo heterogéneo de compuestos tales como emulsiones oleosas (por ejemplo, adyuvantes de Freund), compuestos minerales (como el alumbre), productos bacterianos (como la toxina de Bordetella pertussis) o complejos inmunoestimulantes. Los ejemplos de adyuvantes incluyen, sin limitación, LPS, GP96, oligodesoxinucleótidos CpG, factores de crecimiento y citoquinas, tales como monocinas, linfocinas, interleucinas y quimiocinas. Las

quimiocinas pueden ser IL1, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL12, IFN α , IFN γ , GM-CSF, LT-a. Otros adyuvantes conocidos son hidróxido de aluminio, adyuvante de Freund o aceite como Montanide[®] ISA51. Otros adyuvantes adecuados para su uso en la presente divulgación incluyen lipopéptidos, tales como Pam3Cys.

5 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente divulgación se aplican generalmente en una "cantidad farmacéuticamente eficaz" y en "una preparación farmacéuticamente aceptable".

El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a la no toxicidad de un material que no interactúa con la acción del componente activo de la composición farmacéutica.

10 La expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad que logra una reacción deseada o un efecto deseado sola o junto con dosis adicionales. En el caso del tratamiento de una enfermedad concreta, la reacción deseada se refiere preferentemente a la inhibición del curso de la enfermedad. Esto comprende frenar el progreso de la enfermedad y, en particular, interrumpir o invertir el progreso de la enfermedad. La reacción deseada en un tratamiento de una enfermedad también puede ser un retraso de la aparición o una prevención de la aparición de dicha enfermedad o dicha afección.

15 Una cantidad eficaz de las composiciones descritas en el presente documento dependerá de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, los parámetros individuales del paciente, incluida la edad, la condición fisiológica, el tamaño y el peso, la duración del tratamiento, el tipo de terapia de acompañamiento (si está presente), la vía específica de administración y factores similares. De acuerdo con lo anterior, las dosis administradas de las composiciones descritas en el presente documento pueden depender de varios de dichos parámetros. En el caso de que una reacción en un paciente sea insuficiente con una dosis inicial, se pueden

20 usar dosis más altas (o dosis efectivamente más altas logradas mediante una vía de administración diferente y más localizada).

25 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden contener sales, tampones, conservantes y opcionalmente otros agentes terapéuticos. En una realización, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación comprenden uno o más portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Los conservantes adecuados para usar en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen, sin limitación, cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabeno y timerosal.

30 El término "excipiente" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que puede estar presente en una composición farmacéutica de la presente divulgación pero que no es un ingrediente activo. Ejemplos de excipientes incluyen, sin limitarse a, portadores, aglutinantes, diluyentes, lubricantes, espesantes, agentes tensioactivos, conservantes, estabilizadores, emulsionantes, tampones, agentes aromatizantes o colorantes.

35 El término "diluyente" se refiere a un agente diluyente y/o diluyente. Además, el término "diluyente" incluye uno cualquiera o más de suspensiones y/o medios de mezcla fluidos, líquidos o sólidos. Ejemplos de diluyentes adecuados incluyen etanol, glicerol y agua.

40 El término "portador" se refiere a un componente que puede ser natural, sintético, orgánico o inorgánico en el que el componente activo se combina para facilitar, mejorar o permitir la administración de la composición farmacéutica. Un portador como se usa en el presente documento puede ser uno o más rellenos, diluyentes o sustancias encapsulantes sólidos o líquidos compatibles, que son adecuados para la administración al sujeto. Los portadores adecuados incluyen, sin limitación, agua esterilizada, Ringer, lactato de Ringer, solución estéril de cloruro de sodio, solución salina isotónica, polialquilenglicoles, naftalenos hidrogenados y, en particular, polímeros de lactida biocompatibles, copolímeros de lactida/glicolida o copolímeros de polioxietileno/polioxipropileno. En una realización, la composición farmacéutica de la presente divulgación incluye solución salina isotónica.

45 Los portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R Gennaro edit. 1985).

Los portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticos se pueden seleccionar con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica estándar.

50 En una realización, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden administrar por vía intravenosa, intraarterial, subcutánea, intradérmica o intramuscular. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración local o administración sistémica. La administración sistémica puede incluir administración enteral, que implica absorción a través del tracto gastrointestinal, o administración parenteral. Como se usa en el presente documento, "administración parenteral" se refiere a la administración de cualquier manera que no sea a través del tracto gastrointestinal,

55 tal como mediante inyección intravenosa. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas se

formulan para administración sistémica. En otra realización preferida, la administración sistémica es mediante administración intravenosa.

5 En una realización de todos los aspectos de la divulgación, el ácido nucleico que codifica una citoquina o que codifica un antígeno o variante del mismo se administra sistémicamente. En una realización de todos los aspectos de la divulgación, después de la administración sistémica del ácido nucleico que codifica el antígeno o variante del mismo, se produce la expresión del antígeno o variante del mismo en el bazo. En una realización de todos los aspectos de la divulgación, después de la administración sistémica del ácido nucleico que codifica el antígeno o variante del mismo, se produce la expresión del antígeno o variante del mismo en células presentadoras de antígeno, preferiblemente células presentadoras de antígeno profesionales. En una
10 realización, las células presentadoras de antígenos se seleccionan del grupo que consiste en células dendríticas, macrófagos y células B. En una realización de todos los aspectos de la divulgación, después de la administración sistémica del ácido nucleico que codifica el antígeno o variante del mismo, no se produce o esencialmente no se produce expresión del antígeno o variante del mismo en pulmón y/o hígado. En una realización de todos los aspectos de la divulgación, después de la administración sistémica del ácido nucleico
15 que codifica el antígeno o variante del mismo, la expresión del antígeno o variante del mismo en el bazo es al menos 5 veces la cantidad de expresión en el pulmón.

20 El término "coadministración" como se usa en el presente documento significa un proceso mediante el cual diferentes compuestos o composiciones (por ejemplo, ARN que codifica una interleucina y ARN que codifica un antígeno o una variante del mismo) se administran al mismo paciente simultáneamente, esencialmente al mismo tiempo, o secuencialmente. Si la administración tiene lugar simultáneamente, no es necesario administrar los diferentes compuestos o composiciones dentro de la misma composición.

Tratamientos

25 Los agentes, composiciones y métodos descritos en el presente documento se pueden usar para tratar a un sujeto con una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad caracterizada por la presencia de células enfermas que expresan un antígeno. Las enfermedades particularmente preferidas son las enfermedades cancerosas. Por ejemplo, si el antígeno deriva de un virus, los agentes, composiciones y métodos pueden ser útiles en el tratamiento de una enfermedad viral causada por dicho virus. Si el antígeno es un antígeno tumoral, los agentes, composiciones y métodos pueden ser útiles en el tratamiento de una enfermedad cancerosa en la que las células cancerosas expresan dicho antígeno tumoral.

30 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto. En una realización ejemplar, la respuesta inmunitaria es contra el cáncer.

35 El término "enfermedad" se refiere a una condición anormal que afecta el cuerpo de un individuo. Una enfermedad a menudo se interpreta como una condición médica asociada con síntomas y signos específicos. Una enfermedad puede ser causada por factores originalmente de una fuente externa, como una enfermedad infecciosa, o puede ser causada por disfunciones internas, como enfermedades autoinmunes. En los seres humanos, "enfermedad" se utiliza a menudo de manera más amplia para referirse a cualquier condición que causa dolor, disfunción, angustia, problemas sociales o muerte al individuo afectado, o problemas similares para quienes están en contacto con el individuo. En este sentido más amplio, a veces incluye lesiones, discapacidades, trastornos, síndromes, infecciones, síntomas aislados, conductas desviadas y variaciones atípicas de estructura y función, mientras que en otros contextos y para otros fines pueden considerarse categorías distinguibles. Las enfermedades suelen afectar a las personas no sólo físicamente, sino también emocionalmente, ya que contraer y vivir con muchas enfermedades puede alterar la perspectiva de la vida y la personalidad.

45 En el presente contexto, el término "tratar", "tratamiento" o "intervención terapéutica" se refiere al manejo y cuidado de un sujeto con el fin de combatir una afección tal como una enfermedad o trastorno. El término pretende incluir el espectro completo de tratamientos para una afección determinada que padece el sujeto, tal como la administración del compuesto terapéuticamente eficaz para aliviar los síntomas o complicaciones, retrasar la progresión de la enfermedad, trastorno o afección, para mitigar o aliviar los síntomas y complicaciones, y/o curar o eliminar la enfermedad, trastorno o afección, así como prevenir la afección, entendiendo por prevención el manejo y cuidado de un individuo con el fin de combatir la enfermedad, afección o trastorno e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir la aparición de los síntomas o complicaciones.

55 El término "tratamiento terapéutico" se refiere a cualquier tratamiento que mejore el estado de salud y/o prolongue (aumente) la esperanza de vida de un individuo. Dicho tratamiento puede eliminar la enfermedad en un individuo, detener o retardar el desarrollo de una enfermedad en un individuo, inhibir o retardar el desarrollo de una enfermedad en un individuo, disminuir la frecuencia o gravedad de los síntomas en un individuo y/o disminuir la recurrencia en un individuo que actualmente tiene o que ha tenido previamente una enfermedad.

Los términos “tratamiento profiláctico” o “tratamiento preventivo” se relacionan con cualquier tratamiento que tenga como objetivo evitar que se produzca una enfermedad en un individuo. Los términos “tratamiento profiláctico” o “tratamiento preventivo” se utilizan aquí indistintamente.

5 Los términos “individuo” y “sujeto” se utilizan aquí indistintamente. Se refieren a un ser humano u otro mamífero (por ejemplo, ratón, rata, conejo, perro, gato, ganado vacuno, cerdo, oveja, caballo o primate) que puede padecer o es susceptible a una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) pero que puede o no tener la enfermedad o trastorno. En muchas realizaciones, el individuo es un ser humano. A menos que se indique lo contrario, los términos “individuo” y “sujeto” no denotan una edad particular y, por tanto, abarcan adultos, ancianos, niños y recién nacidos. En realizaciones de la presente divulgación, el “individuo” o “sujeto” es un
10 “paciente”.

El término “paciente” significa un individuo o sujeto para tratamiento, en particular un individuo o sujeto enfermo.

En una realización de la divulgación, el objetivo es proporcionar una respuesta inmunitaria contra células enfermas que expresan un antígeno tal como células cancerosas que expresan un antígeno tumoral, y tratar una enfermedad tal como una enfermedad cancerosa que involucra células que expresan un antígeno tal como
15 un antígeno tumoral.

Se puede provocar una respuesta inmunitaria contra un antígeno que puede ser terapéutica o protectora parcial o total. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento son aplicables para inducir o mejorar una respuesta inmunitaria. Por tanto, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento son útiles en un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una enfermedad que implica un antígeno.

20 Como se usa en el presente documento, “respuesta inmunitaria” se refiere a una respuesta corporal integrada a un antígeno o una célula que expresa un antígeno y se refiere a una respuesta inmunitaria celular y/o una respuesta inmunitaria humoral. Una respuesta inmunitaria celular incluye, sin limitación, una respuesta celular dirigida a células que expresan un antígeno. Dichas células pueden caracterizarse por la expresión de un antígeno en su superficie celular o por la presentación de un antígeno con una molécula MHC de clase I o clase
25 II. La respuesta celular se relaciona con los linfocitos T, que pueden clasificarse como células T auxiliares (también denominadas células T CD4+) que desempeñan una función central al regular la respuesta inmunitaria o linfocitos citolíticos (también denominadas células T citotóxicas, células T CD8+ o CTL) que inducen la apoptosis en células infectadas o células cancerosas. En una realización, la administración de una composición farmacéutica de la presente divulgación implica la estimulación de una respuesta de células T CD8+ antitumorales contra células cancerosas que expresan uno o más antígenos tumorales.
30

La presente divulgación contempla una respuesta inmunitaria que puede ser protectora, preventiva, profiláctica y/o terapéutica. Como se usa en el presente documento, “induce [o induce] una respuesta inmunitaria” puede indicar que no estaba presente ninguna respuesta inmunitaria contra un antígeno particular antes de la inducción o puede indicar que había un nivel basal de respuesta inmunitaria contra un antígeno particular antes
35 de la inducción, que era mejorado después de la inducción. Por lo tanto, “induce [o induce] una respuesta inmunitaria” incluye “potencia [o potencia] una respuesta inmunitaria”.

El término “inmunoterapia” se refiere al tratamiento de una enfermedad o afección induciendo o potenciando una respuesta inmunitaria.

40 El término “vacunación” o “inmunización” describe el proceso de administrar un antígeno a un individuo con el fin de inducir una respuesta inmunitaria, por ejemplo, por razones terapéuticas o profilácticas.

En una realización, la presente divulgación prevé realizaciones en las que se administran formulaciones de ARN tales como partículas de ARN como se describe en el presente documento.

45 El término “macrófago” se refiere a un subgrupo de células fagocíticas producidas por la diferenciación de monocitos. Los macrófagos que se activan por inflamación, citoquinas inmunes o productos microbianos envuelven y matan de manera no específica patógenos extraños dentro del macrófago mediante un ataque hidrolítico y oxidativo que resulta en la degradación del patógeno. Los péptidos de proteínas degradadas se muestran en la superficie de las células de los macrófagos, donde pueden ser reconocidos por las células T, y pueden interactuar directamente con los anticuerpos en la superficie de las células B, lo que resulta en la activación de las células T y B y una mayor estimulación de la respuesta inmunitaria. Los macrófagos pertenecen a la clase de células presentadoras de antígenos. En una realización, los macrófagos son macrófagos esplénicos.
50

55 El término “célula dendrítica” (DC) se refiere a otro subtipo de células fagocíticas que pertenecen a la clase de células presentadoras de antígenos. En una realización, las células dendríticas se derivan de células progenitoras hematopoyéticas de médula ósea. Estas células progenitoras inicialmente se transforman en células dendríticas inmaduras. Estas células inmaduras se caracterizan por una alta actividad fagocítica y un bajo potencial de activación de células T. Las células dendríticas inmaduras toman muestras constantemente del entorno circundante en busca de patógenos como virus y bacterias. Una vez que han entrado en contacto

con un antígeno presentable, se activan hasta convertirse en células dendríticas maduras y comienzan a migrar al bazo o al ganglio linfático. Las células dendríticas inmaduras fagocitan los patógenos y degradan sus proteínas en pequeños trozos y, al madurar, presentan esos fragmentos en la superficie celular utilizando moléculas MHC. Al mismo tiempo, regulan positivamente los receptores de la superficie celular que actúan como correceptores en la activación de las células T, como CD80, CD86 y CD40, mejorando en gran medida su capacidad para activar las células T. También regulan positivamente CCR7, un receptor quimiotáctico que induce a las células dendríticas a viajar a través del torrente sanguíneo hasta el bazo o a través del sistema linfático hasta un ganglio linfático. Aquí actúan como células presentadoras de antígenos y activan las células T colaboradoras y las células T citotóxicas, así como las células B, presentándoles antígenos, junto con señales coestimuladoras no específicas de antígenos. Por lo tanto, las células dendríticas pueden inducir activamente una respuesta inmunitaria relacionada con las células T o B. En una realización, las células dendríticas son células dendríticas esplénicas.

El término “célula presentadora de antígeno” (APC) es una célula de una variedad de células capaces de mostrar, adquirir y/o presentar al menos un antígeno o fragmento antigénico en (o en) su superficie celular. Las células presentadoras de antígenos se pueden distinguir en células presentadoras de antígenos profesionales y células presentadoras de antígenos no profesionales.

El término “células presentadoras de antígenos profesionales” se refiere a células presentadoras de antígenos que expresan constitutivamente las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (MHC clase II) necesarias para la interacción con células T vírgenes. Si una célula T interactúa con el complejo molecular MHC de clase II en la membrana de la célula presentadora de antígeno, la célula presentadora de antígeno produce una molécula coestimuladora que induce la activación de la célula T. Las células presentadoras de antígenos profesionales comprenden células dendríticas y macrófagos.

El término “células presentadoras de antígenos no profesionales” se refiere a células presentadoras de antígenos que no expresan constitutivamente moléculas de MHC de clase II, sino tras la estimulación por determinadas citoquinas tales como el interferón gamma. Las células presentadoras de antígenos no profesionales a modo de ejemplo incluyen fibroblastos, células epiteliales del timo, células epiteliales de la tiroides, células gliales, células beta pancreáticas o células endoteliales vasculares.

“Procesamiento de antígeno” se refiere a la degradación de un antígeno en productos de procesamiento, que son fragmentos de dicho antígeno (por ejemplo, la degradación de una proteína en péptidos) y la asociación de uno o más de estos fragmentos (por ejemplo, mediante unión) con MHC. moléculas para su presentación por células, tales como células presentadoras de antígenos a células T específicas.

El término “enfermedad que implica un antígeno”, “enfermedad que implica células que expresan un antígeno” o términos similares se refieren a cualquier enfermedad que implica un antígeno, por ejemplo, una enfermedad que se caracteriza por la presencia de un antígeno. La enfermedad puede ser una enfermedad infecciosa, un cáncer o simplemente cáncer. Como se mencionó anteriormente, el antígeno puede ser un antígeno asociado a una enfermedad, tal como un antígeno asociado a un tumor, un antígeno viral o un antígeno bacteriano. Preferiblemente una enfermedad que involucra un antígeno es una enfermedad que involucra células que expresan un antígeno, preferiblemente en la superficie celular.

El término “enfermedad infecciosa” se refiere a cualquier enfermedad que puede transmitirse de un individuo a otro o de un organismo a otro y está causada por un agente microbiano (por ejemplo, un resfriado común). Las enfermedades infecciosas son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, una enfermedad viral, una enfermedad bacteriana o una enfermedad parasitaria, enfermedades causadas por un virus, una bacteria y un parásito, respectivamente. En este sentido, las enfermedades infecciosas pueden ser, por ejemplo, hepatitis, enfermedades de transmisión sexual (por ejemplo, clamidia o gonorrea), tuberculosis, VIH/síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), difteria, hepatitis B, hepatitis C, cólera, enfermedades respiratorias agudas graves (SARS), la gripe aviar y la gripe.

Los términos “enfermedad cancerosa” o “cáncer” se refieren o describen la condición fisiológica en un individuo que típicamente se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cánceres incluyen, entre otros, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Más particularmente, ejemplos de tales cánceres incluyen cáncer de huesos, cáncer de sangre, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de recto, cáncer de la región del ano, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de útero, carcinoma de los órganos sexuales y reproductivos, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de tiroides, cáncer de glándula paratiroidea, cáncer de glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), cáncer neuroectodérmico, tumores del eje espinal, glioma, meningioma y adenoma hipofisario. El término “cáncer” de acuerdo con la divulgación también comprende metástasis de cáncer.

Las estrategias combinadas en el tratamiento del cáncer pueden ser deseables debido al efecto sinérgico resultante, que puede ser considerablemente más fuerte que el impacto de un enfoque monoterapéutico. En una realización, la composición farmacéutica se administra con un agente inmunoterapéutico. Tal como se utiliza en el presente documento, "agente inmunoterapéutico" se refiere a cualquier agente que pueda estar implicado en la activación de una respuesta inmunitaria específica y/o función(es) efectora inmune(s). La presente divulgación contempla el uso de un anticuerpo como agente inmunoterapéutico. Sin querer limitarse a ninguna teoría, los anticuerpos son capaces de lograr un efecto terapéutico contra las células cancerosas a través de diversos mecanismos, incluida la inducción de la apoptosis, el bloqueo de componentes de las vías de transducción de señales o la inhibición de la proliferación de células tumorales. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo monoclonal puede inducir la muerte celular mediante citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), o unirse a proteínas del complemento, lo que lleva a una toxicidad celular directa, conocida como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Los ejemplos no limitantes de anticuerpos anticancerígenos y posibles dianas de anticuerpos (entre paréntesis) que pueden usarse en combinación con la presente divulgación incluyen:

Abagovomab (CA-125), Abciximab (CD41), Adecatumumab (EpCAM), Afutuzumab (CD20), Alacizumab pegol (VEGFR2), Altumomab pentetato (CEA), Amatuximab (MORAb-009), Anatumomab mafenatox (TAG-72), Apolizumab (HLA-DR), Arcitomab (CEA), Atezolizumab (PD-L1), Bavituximab (fosfatidilserina), Bectumomab (CD22), Belimumab (BAFF), Bevacizumab (VEGF-A), Bivatuzumab mertansina (CD44 v6), Blinatumomab (CD 19), Brentuximab vedotin (CD30 TNFRSF8), Cantuzumab mertansine (mucina CanAg), Cantuzumab ravtansine (MUC1), Capromab pendetide (células de carcinoma de próstata), Carlumab (CNT0888), Catumaxomab (EpCAM, CD3), Cetuximab (EGFR), Citatuzumab bogatox (EpCAM), Cixutumumab (receptor IGF-1), Claudiximab (Claudin), Clivatuzumab tetraxetan (MUC1), Conatumumab (TRAIL-R2), Dacetuzumab (CD40), Dalotuzumab (receptor I del factor de crecimiento similar a la insulina), Denosumab (RANKL, Detumomab (linfoma de células B), Drozitumab (DR5), Ecomeximab (gangliósido GD3), Edrecolomab (EpCAM), Elotuzumab (SLAMF7), Enavatuzumab (PDL192), Ensituximab (NPC-1C), Epratuzumab (CD22), Ertumaxomab (HER2/neu, CD3), Etaracizumab (integrina $\alpha\beta 3$), Farletuzumab (receptor de folato 1), FBTA05 (CD20), Ficlaturumab (SCH 900105), Figitumumab (receptor de IGF-1), Flanvotumab (glicoproteína 75), Fresolimumab (TGF- β , Galiximab (CD80), Ganitumab (IGF-I), Gemtuzumab ozogamicina (CD33), Gevokizumab (IL1 β), Girentuximab (anhidrasa carbónica 9 (CA-IX)), Glembatumumab vedotina (GPNMB), Ibritumomab tiuxetan; (CD20), Icrucumab (20), Igovoma (CA-125), Indatuximab ravtansina (SDC1), Intetumumab (CD51), Inotuzumab ozogamicina (CD22), Ipilimumab (CD 152), Iratumumab (CD30), Labetuzumab (CEA), Lexatumumab (TRAIL-R2), Libivirumab (antígeno de superficie de la hepatitis B), Lintuzumab (CD33), Lorvotuzumab mertansina (CD56), Lucatumumab (CD40), Lumiliximab (CD23), Mapatumumab (TRAIL-R1), Matuzumab (EGFR), Mepolizumab (IL5), Milatuzumab (CD74), Mitumomab (gangliósido GD3), Mogamulizumab (CCR4), Moxetumomab pasudotox (CD22), Nacolomab tafenatox (antígeno C242), Naptumomab stafenatox (5T4), Namatumab (RON), Necitumumab (EGFR), Nimotuzumab (EGFR), Nivolumab (IgG4), Ofatumumab (CD20), Olaratumab (PDGF-R a), Onartuzumab (quinasa del receptor del factor de dispersión humano), Oportuzumab monatox (EpCAM), Oregovomab (CA-125), Oxelumab (OX-40), Panitumumab (EGFR), Patritumab (HER3), Pentumoma (MUC1), Pertuzuma (HER2/neu), Pintumomab (antígeno de adenocarcinoma), Pritumumab (vimentina), Racotumomab (ácido N-glicililneuramínico), Radretumab (fibronectina dominio extra-B), Rafivirumab (glucoproteína del virus de la rabia), Ramucirumab (VEGFR2), Rilotumumab (HGF), Rituximab (CD20), Robatumumab (receptor de IGF-1), Samalizumab (CD200), Sibrotuzumab (FAP), Siltuximab (IL6), Tabalumab (BAFF), Tacatuzumab tetraxetan (alfa-200), Taplitumomab paptox (CD19), Tenatumomab (tenascina C), Teprotumumab (CD221), Ticilimumab (CTLA-4), Tigatuzumab (TRAIL-R2), TNX-650 (IL13), Tositumomab (CD20), Trastuzumab (HER2 /neu), TRBS07 (GD2), Tremelimumab (CTLA-4), Tucotuzumab celmoleukin (EpCAM), Ublituximab (MS4A1), Urelumab (4-1 BB), Volociximab (integrina $\alpha 5\beta 1$), Votumumab (antígeno tumoral CTA 16.88), Zalutumumab (EGFR) y Zanolimumab (CD4).

La cita de documentos y estudios a los que se hace referencia en este documento no pretende ser una admisión de que cualquiera de los anteriores es técnica anterior pertinente. Todas las declaraciones sobre el contenido de estos documentos se basan en la información disponible para los solicitantes y no constituyen ninguna admisión sobre la exactitud del contenido de estos documentos.

La siguiente descripción se presenta para permitir que un experto en la técnica realice y utilice las diversas realizaciones. Las descripciones de dispositivos, técnicas y aplicaciones específicas se proporcionan únicamente como ejemplos. Varias modificaciones a los ejemplos descritos en el presente documento serán fácilmente evidentes para aquellos con experiencia habitual en la técnica, y los principios generales definidos en el presente documento se pueden aplicar a otros ejemplos y aplicaciones. Por lo tanto, no se pretende que las diversas realizaciones se limiten a los ejemplos descritos y mostrados en el presente documento.

Ejemplos

Ejemplos:

60 Métodos:

Animales

C57BL/6BrdCrHsd-tiro^c Los ratones se compraron en Envigo Labs. A lo largo de los experimentos se utilizaron animales de la misma edad (8-10 semanas de edad) y sexo (macho o hembra). Se criaron ratones congénicos C57Bl/6-Thy1.1 en las instalaciones para animales de BioNTech AG, Alemania.

Construcción de CAR/ células T CAR

5 Se utilizó un vector autoinactivante (SIN) gamma-retroviral pES.12-6 para sobreexpresar de forma estable CLDN6-CAR-BBz-T2A-Luc-T2A-GFP en células T murinas bajo el control de un promotor eucariota interno, el corto Versión sin intrones del promotor del factor de elongación 1-alfa humano (EFS -213/+31). La columna vertebral del vector contiene las secuencias de tipo salvaje de MLV de las regiones R y U5 en las LTR 5' y 3', así como la región empaquetadora (psi y psi+). Se eliminaron los elementos potenciadores en la región U3 de 3'-LTR (incluida la caja CAAT) y se mutó la secuencia de la caja TATA para evitar el inicio de la transcripción. 10 La versión truncada del elemento regulador postranscripcional (PRE) del virus de la hepatitis de la marmota (WHV) se utiliza para prevenir la expresión de proteínas virales no deseadas. El CLDN6-CAR-BBz comprende un péptido de señalización de IgG humana (SEQ ID NO: 12), un fragmento Fv de cadena sencilla del anticuerpo específico de Claudin6 IMAB206 (Ganymed Pharmaceuticals) con un enlazador (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 14) entre 15 los pesados (V_H) (SEQ ID NO: 13) y ligeros (V_L) (SEQ ID NO: 15) cadena con sustitución de cisteína por serina en la posición 46 de la V_L. El fragmento ScFv está fusionado con la bisagra CD8α humana y la región transmembrana (SEQ ID NO: 16) seguido de 4-1BB humano (SEQ ID NO: 17) y CD3ζ humano (Q14K) (SEQ ID NO: 18) fragmentos de señalización. El CAR está enlazado con elementos de salto ribosómico T2A (SEQ ID NO: 19) a la luciferasa de luciérnaga eficaz (SEQ ID NO: 20) así como a eGFP (SEQ ID NO: 21) que permite 20 la producción equimolar de las proteínas indicadas en células T transducidas.

Manipulación de genes retrovirales y preparación de células T con CAR para la transferencia de células T adoptivas

Esplenocitos de C57Bl/6-Thy1.1⁺ nultratados fueron aislados y preactivados por Dynabeads™ Activador T CD3/CD28 de ratón en una proporción de cuentas a células T de 1:1 (Invitrogen) en presencia de 5 ng/ml de IL-7 humana recombinante (rh) y 5 ng/ml de IL-15 rh (Miltenyi Biotec). Para la transducción de células murinas, se cargaron sobrenadantes retrovirales pseudotipados con MLV-E en RetroNectin (2 µg/cm²) placas de pocillos tratadas con cultivo no tisular recubierto de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Takara Bio Inc., Otsu, 25 Japón), con 3 ciclos repetidos de carga de virus y centrifugación (1,300 xg, 15 °C, 15 min) para una mayor unión 24 h después de la preactivación, 0.5-0.6×10⁶ células/cm² se centrifugó (300 xg, 37 °C, 1 h) en pocillos recubiertos con partículas virales. Después de una noche de cultivo, la transducción por centrifugación se repitió con placas recubiertas de partículas virales frescas. 72 horas después de la preactivación, se retiraron las Dynabeads™ Mouse T-Activator CD3/CD28 del cultivo y las células se expandieron en presencia de 5 ng/mL de IL-7 humana recombinante (rh IL-7) y 5 ng/mL de IL-15 humana recombinante (rh IL-15). Después de la limpieza con Ficoll, las células se lavaron dos veces con PBS para eliminar las proteínas del suero y luego se 30 prepararon para la transferencia de células adoptivas (ACT). Vectores retrovirales basados en pES12.6 que contienen OT1-TCR o CLDN6-CAR codificados y también luciferasa de luciérnaga mejorada (effLuc; Rabinovich et al. (2008) PNAS 105(38):14342-6) y el gen indicador eGFP (proteína de fluorescencia verde mejorada), que se expresaba por separado utilizando elementos de empalme 2A (Szymczak et al. (2004) Nat Biotechnol. 22(5):589-94) se utilizaron para la transducción.

40 Generación de ARNm transcrito *in vitro* (IVT)

Las transcripciones *in vitro* de la proteína de fusión citoquina-albúmina que codifican los ARNm se basaron en las estructuras principales del plásmido pST4-T7-GG-TEV-MCS-FI-A30LA70 y en construcciones de ADN derivadas. Estas construcciones de plásmido contienen la secuencia líder 5' del virus del grabado del tabaco (TEV), un elemento FI 3' (donde F es un fragmento 3'-UTR de 136 nucleótidos de longitud del potenciador amino-terminal de la división, ARNm e I es un fragmento 3'-UTR de 142 nucleótidos de longitud) fragmento 45 largo de ARN 12S codificado mitocondrialmente, ambos identificados en Homo sapiens; WO 2017/060314) y una cola poli(A) de 100 nucleótidos, con un conector después de 70 nucleótidos. Las secuencias codificantes de citoquinas y albúmina sérica se originan en Mus musculus y no se introdujeron cambios en las secuencias de aminoácidos resultantes ((m)IL-2 de ratón, SEQ ID NO: 5, mL7, SEQ ID NO: 6 y mL21, SEQ ID NO: 7). 50 Las proteínas codificadas están equipadas con un péptido señal (SP) terminal N que es el SP nativo de la fracción terminal N. Sólo se mantuvo el SP de la fracción terminal N, para otros fracciones sólo se codificó la porción madura (proteína sin SP). El codón de parada se mantuvo únicamente para la fracción más terminal C. Los fracciones de albúmina y citoquina en las construcciones se separaron mediante una secuencia conectora de 30 nucleótidos de longitud que codifica los residuos de glicina y serina. La orientación de las proteínas de 55 fusión de albúmina-citoquina utilizadas fue la siguiente: albúmina-enlazador-mIL2 (consecutivas desde el terminal N al terminal C SEQ ID NO: 8, 9 y 10), albúmina-enlazador mL7 (SEQ ID NO consecutivas desde el terminal N al terminal C: 6, 9 y 11) y mL21 -albúmina enlazadora (consecutivas desde el terminal N al terminal C SEQ ID NO: 7, 9 y 11). Las transcripciones *in vitro* de ARNm que codifican antígenos se basaron en las estructuras principales del plásmido pST1-T7-GG-hAg-MCS-2hBg-A30LA70 y en construcciones de ADN derivadas. Estas construcciones de plásmido contienen además del epítipo de ovoalbúmina de pollo o CLDN6 60 humano de longitud completa SIINFEKL (Oval; además flanqueado por una secuencia 3' Sec y una 5' TM1

- como se describe en Kreiter et al (2008) J Immunol. 180(1):309-18) la α -globina humana 5', dos UTR de β -globina humana 3' en serie y una cola poli(A) de 100 nucleótidos, con un enlazador después de 70 nucleótidos. El ARNm que codifica antígenos y citoquinas se generó mediante transcripción *in vitro* como se describe por Holtkamp S. et al. (2006) Blood 108(13):4009-17. Este último se modificó adicionalmente mediante la sustitución del nucleósido normal uridina por 1-metil-pseudouridina. Los ARNm de citoquinas resultantes se equiparon con una estructura Cap1 y las moléculas de doble hebra (ARNbc) se agotaron mediante purificación de celulosa. El ARNm purificado se eluyó en H₂O y almacenado a -80°C hasta su uso posterior *in vitro*. La transcripción de todas las construcciones de ARNm descritas se llevó a cabo en BioNTech RNA Pharmaceuticals GmbH.
- 5
- 10 Generación de antígeno formulado en liposomas que codifica IVT RNA (RNA_(LIP))
- La complejación del antígeno que codifica el ARN IVT con liposomas se describió previamente en Kranz et al (2016) Nature 534(7607):396-401. Se utilizó una relación de carga de 1.3 a 2 de DOTMA catiónico y ARN. Además de DOTMA, la fracción lipídica contiene el lípido auxiliar DOPE en una proporción molar de 2:1 DOTMA por DOPE.
- 15 Experimentos con ratones
- Se transfirieron por vía intravenosa (iv) 5 x 10⁶ células T Thy1.1+ congénicas CAR o TCR transducidas con retrovirales gamma en 200 μ l a ratones donantes C57BL/6BrdCrHsd-Tyr inmunocompetentes o moderadamente irradiados con todo el cuerpo (2.5 Gy - XRAD320). Posteriormente, los ratones fueron administrados por vía intravenosa (i.v.) vacunados con una proporción F12:ARN de 1.3:2 de antígeno que codifica ARN_(LIP) en varios momentos después de ACT. En los puntos de tiempo indicados, los ratones se trataron repetidamente con 1 μ g de ARNm codificado por proteína de fusión de albúmina-citoquina murina modificada con nucleósidos formulado con TransIT (Mirrus) o tampón solo. La donación de sangre periférica y las imágenes de bioluminiscencia de todo el cuerpo se realizaron en los momentos indicados.
- 20
- Imágenes de luciferasa in vivo (BLI)
- 25 La expansión y distribución de células T transducidas con CAR o TCR-effLuc-GFP se evaluaron mediante in vivo Imágenes de bioluminiscencia utilizando el sistema de imágenes IVIS Lumina (Caliper Life Sciences). Brevemente, se inyectó una solución acuosa de D-luciferina (80 mg/kg de peso corporal; Perkin Elmer) i.p. en los puntos de tiempo indicados después de la transferencia adoptiva de células T transducidas. 5 minutos después, se cuantificaron los fotones emitidos (tiempo de integración de 1 min, agrupamiento 8). En vivo La bioluminiscencia en regiones de interés (ROI) se cuantificó como flujo total (fotones/s) utilizando el software IVIS Living Image 4.0. La intensidad de la luz transmitida procedente de las células que expresan luciferasa dentro del animal se representó como una imagen en escala de grises, donde el negro es la señal de bioluminiscencia menos intensa y del blanco al gris oscuro la más intensa. Se obtuvieron imágenes de referencia en escala de grises de ratones bajo iluminación LED con poca luz. Las imágenes se superpusieron utilizando el software Living Image 4.0.
- 30
- 35
- Ejemplo 1: Las citoquinas de cadena gamma farmacocinéticamente extendida seleccionadas (IL-2/7) conducen a una expansión repetitiva de las células T CAR in vivo al contacto con el antígeno.
- Por lo general, es necesario que esté presente un cierto medio de citoquinas para mantener la persistencia de las células T tras el contacto con el antígeno. Se ha demostrado que las citoquinas de cadena gamma, por ejemplo IL-2 e IL-7, mejoran la proliferación y supervivencia de las células T (por ejemplo, Blattman et al. (2003) Nat. Med. 9(5):540-7, Fry et al. (2001) Trends Immunol. 22(10):564-71, Bradley et al. (2005) Trends Immunol. 26(3):172-6, Jiang et al. (2005) Cytokine Growth Factor Rev. 16(4-5):513-33). Sin embargo, el uso de citoquinas recombinantes, como la IL-2, se ha visto limitado por su corta vida media y su toxicidad dependiente de la dosis. Vial et al. (1992) Drug Saf. 7(6):417-33). Para superar el soporte limitado de citoquinas de las células T transferidas adoptivamente, se desarrollaron construcciones de ARNm que codifican la proteína de fusión citoquina-albúmina y que, de hecho, podrían aumentar significativamente las vidas medias séricas de las citoquinas codificadas in vivo tras la administración sistémica. La disponibilidad sistémica de las construcciones citoquina-albúmina se prolonga cuando se codifican en ARNm modificado con nucleósidos.
- 40
- 45
- 50 Por lo tanto, nos preguntamos si una combinación de TAA formulado liposomalmente, por ejemplo, ARN que codifica CLDN6 (ARN_(LIP)), que se dirige selectivamente a las APC en órganos linfoides secundarios y el soporte de citoquinas seleccionadas puede conducir a una expansión repetitiva adecuada y a la persistencia de las células T CAR in vivo. Para probar este concepto, las células T CLDN6-CAR transducidas con retrovirus gamma se transfirieron adoptivamente a ratones moderadamente irradiados (2.5 Gy) o inmunocompetentes. (Figura 1 y 2 respectivamente). Para visualizar la expansión y el destino de esas células T CLDN6-CAR murinas in vivo Aprovechamos la coexpresión de luciferasa y reportero GFP en el mismo vector retroviral que codifica CLDN6 CAR separado por secuencias virales T2A. (Figura 1A). Es de destacar que la expresión superficial y la especificidad del antígeno de CLDN6-CAR no se vieron afectadas significativamente por la coexpresión de luciferasa y GFP en células T murinas transducidas con CAR (datos no mostrados).
- 55

A ratones albinos C57Bl/6 moderadamente irradiados (2.5 Gy con XRAD320) se les injertó 5×10^6 CLDN6-CAR-reporter transdujo células T murinas a granel Thy1.1+ PR congénicas (aprox. 2.5×10^8 células/kg de peso corporal). Se formularon 20 µg de ARN de control o que codifica CLDN6 en liposomas dirigidos al bazo y se inyectaron por vía intravenosa en ratones 1 día después de la transferencia adoptiva de CAR-T. Concomitante con la vacunación ARN_(LIP) CLDN6, los ratones recibieron IL-2 murina acoplada a albúmina por vía intraperitoneal y ARNm codificante de IL-7 murina formulado en TransIT (1 µg/ARN de citoquina) o control simulado (tampón). El tratamiento se repitió 7 días después. En los momentos indicados se realizó un seguimiento de la expansión y biodistribución de CAR-T en vivo mediante administración intraperitoneal de 1.66 mg de solución de D-luciferina por ratón. 24 horas después del ACT, la mayoría de las células T CAR ya se encontraban en el bazo. En ausencia de citoquinas (simulado), se indujo un aumento de ~21 veces (en comparación con el día 1) en las células T CAR exclusivamente mediante el tratamiento con CLDN6-ARN_(LIP) como se detecta en bioluminiscencia el día 4 después de ACT. El segundo impulso con CLDN6-ARN_(LIP) dio como resultado en el día 11 una intensidad de luminiscencia aún 15 veces mayor en comparación con la luminiscencia inicial medida en el día 1. Se logró una expansión de 75 veces de las células T CAR después del primer tratamiento con ARN_(LIP) y se mejoró aún más con el segundo tratamiento de ARN_(LIP) de CLDN6 hasta 114 veces (Figura 1C&D). Este efecto se observó en ratones que habían recibido células T CAR de CLDN6 después del tratamiento solo con ARN_(LIP) que codifica CLDN6 o en combinación con ARN que codifican citoquinas-albúmina, pero no en los grupos de control respectivos que recibieron ARN_(LIP) de control que codifica Oval, ni en presencia ni en ausencia de ARN que codifican citoquinas-albúmina. Estos datos demuestran que las células T CAR pueden expandirse exitosamente in situ de manera altamente específica al antígeno en ratones moderadamente irradiados.

Después de haber demostrado que las células T CAR pueden expandirse repetidamente en el lugar usando ARN_(LIP) codificando el antígeno respectivo en presencia de citoquinas que codifican ARN en ratones moderadamente irradiados, investigamos si este efecto también se puede lograr en un huésped inmunocompetente. Sin embargo, desde entonces, la linfodepleción tiene varias desventajas, incluidos los efectos secundarios bien conocidos y los riesgos asociados con las quimioterapias, como posibles infecciones y sepsis (Brentjens et al. (2010) Mol Ther. 18(4):666-8 & Robbins et al. (2015) Clin Cancer Res. 21(5):1019-27). Además, en casos de toxicidad dentro y/o fuera del objetivo, la rápida expansión de las células T CAR transferidas adoptivamente podría ser fatal (Morgan et al. (2010) Mol Ther. 18(4):843-51). Para este propósito, se trataron ratones albinos C57Bl/6 no irradiados injertados con células T murinas Thy1.1+ transducidas con CLDN6-CAR, como se describió anteriormente (Figura 2A). La presencia sistémica de IL-2 e IL-7 durante la primera ronda de estimulación no tiene un impacto significativo en la expansión de las células T CLDN6-CAR después de vacunación CLDN6-ARN_(LIP) en comparación con el grupo de control, que recibe tampón (simulado) en lugar de ARN codificantes de citoquina-albúmina formulados con TransIT (día 4: índice de expansión: simulado 192 veces e IL-2/7: 223 veces). Sin embargo, en ausencia de citoquinas IL-2/7, la población de células T CAR se contrajo fuertemente después del primer CLDN6-ARN_(LIP) la expansión mediada y no pudo volver a expandirse por segunda vez. Solo en presencia de ARN que codifica IL-2/IL-7 unido a albúmina, las células T CAR de CLDN6 pueden expandirse repetidamente y persistir durante varios días en ratones inmunocompetentes (día 11: índice de expansión: simulación: 0.5 veces y IL-2/7: 79 veces) (Figura 2B+C).

Estos datos apoyan firmemente la idea de que la expansión controlada de células T CAR directamente en el paciente utilizando la tecnología RNA_(LIP) es factible, pero para la persistencia, las células necesitan un entorno de citoquinas favorable, como IL-2 e IL-7, lo cual puede lograrse mediante la administración de ARN que codifica citoquinas de cadena gamma con farmacocinética extendida.

Ejemplo 2: Combinación óptima de fusiones de citoquinas y albúmina durante la expansión repetitiva de células CAR T.

Dado que varias citoquinas de la cadena gamma apoyan positivamente la supervivencia de las células T y apoyan los efectos terapéuticos de las células T de una manera específica para el antígeno (por ejemplo, Markley et al. (2010) Blood 115(17):3508-19, He et al. (2006) J Transl Med. 4:24.), comparamos el ARN modificado con nucleósidos que codifica mL-2, mL-7, mL-21 y la combinación IL-2/7 e IL-2/21 en términos de facilitar los efectos de apoyo de la proliferación y persistencia de células T modificadas con CAR in vivo sobre tratamiento con ARN_(LIP) repetitivo.

De manera similar a lo descrito en el Ejemplo 1, ratones albinos C57Bl/6 moderadamente irradiados con células T transducidas con el CLDN6-CAR indicador fueron vacunados con ARN codificando hCLDN6 o control (ctrl) formulado liposomalmente, concomitantemente con el tratamiento de ARN que codifica albúmina murina acoplada a mL-2, mL-7, mL-21 en ARNm formulado en TransIT (1 mg/citoquina ARN) o ARN que codifica albúmina murina (Alb ctrl). El cóctel de antígeno/citoquinas se administró con un intervalo de una semana entre cada uno (Figura 3A). En el pico de expansión in vivo de las células T CAR (generalmente alcanzado después de 2-3 días post tratamiento basado en ARN), se analizó la intensidad de la bioluminiscencia (Figura 3B). La presencia sistémica de IL-7 e IL-21 por sí sola resultó en una reducción de las capacidades de expansión específica del antígeno de T CAR tras tratamientos repetitivos con ARN_(LIP) en comparación con el control de albúmina. El tratamiento conjunto con IL-2 resultó en una expansión de las células T CAR de hasta 164 veces en comparación con la línea de base. Sin embargo, solo se logró una acumulación in vivo de células T CAR

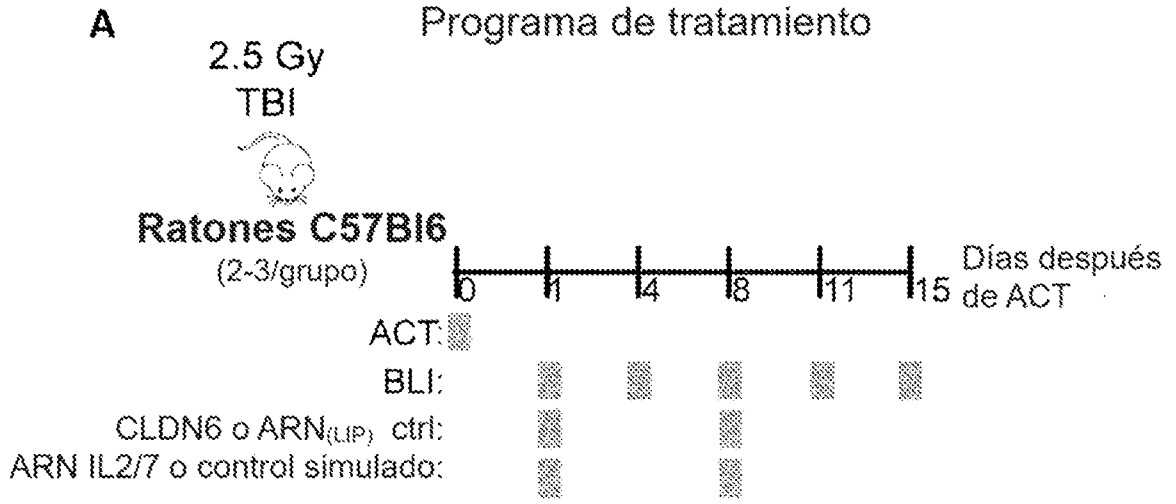
cuando el ARN de IL-2 fue coadministrado con IL-7 (hasta un aumento de 214 veces después de la 3^a ronda de expansión) o IL-21 (hasta un aumento de 141 veces después de la 3^a ronda de expansión), respectivamente. Además de la capacidad de acumulación de células T CAR in vivo, el éxito clínico de la terapia de células T reactivas al tumor transferidas adoptivamente también ha sido correlacionado positivamente con la persistencia de esas células in vivo (Robbins et al. (2004) *J Immunol.* 173(12):7125-30, Huang et al. (2005) 28(3):258-67).
5 Por lo tanto, analizamos la contracción de las células T CART después de 3 rondas de expansión específica de antígeno utilizando bioluminiscencia en presencia de IL-7 (Figura 3C) o en presencia de IL-21 (Figura 3D), ya sea solas o en combinación con IL-2. Mientras que la población de células T CAR se contrajo poco después de la 3^a ronda de ARN_(LIP) de CLDN6 cuando solo estaban presentes albúmina, IL-2 o IL-7. Sin embargo, solo
10 la combinación de IL-2 e IL-7 puede aumentar la desaceleración de la contracción de las células T CAR de CLDN6 después de la retirada del antígeno (Figura 3C). El efecto fue aún más distintivo en los ratones tratados conjuntamente con ARN de IL-2 e IL-21 (Figura 3D).

En general, estos resultados indican que la administración sistémica de ARN modificado con nucleósidos que codifica IL-2 y en combinación con IL-7 e IL-21 puede aumentar la acumulación altamente dependiente de
15 antígeno y la persistencia prolongada de células T CAR en vivo tras la estimulación específica de antígeno.

REIVINDICACIONES

1. Una preparación médica que comprende:
 - a. Células T modificadas genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR),
 - b. IL2 o un polinucleótido que codifica IL2, y
- 5 c. una citoquina adicional o un polinucleótido que codifica la citoquina adicional, en la que la citoquina adicional se selecciona del grupo que consiste en IL7 e IL21.
2. La preparación médica de la reivindicación 1, en la que el polinucleótido que codifica IL2 es ARN y opcionalmente el polinucleótido que codifica la citoquina adicional es ARN.
- 10 3. La preparación médica de la reivindicación 1 o 2, que comprende además un antígeno o una variante del mismo, o un polinucleótido que codifica el antígeno o variante, en la que las células T genéticamente modificadas para expresar un CAR están dirigidas al antígeno.
4. La preparación médica de la reivindicación 3, en la que el polinucleótido que codifica el antígeno o variante es ARN.
5. La preparación médica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un kit.
- 15 6. La preparación médica de la reivindicación 5, que comprende las células T genéticamente modificadas para expresar un CAR, la IL2 o el polinucleótido que codifica IL2, la citoquina adicional o el polinucleótido que codifica una citoquina adicional y opcionalmente el antígeno o una variante del mismo, o el polinucleótido que codifica el antígeno o variante en recipientes separados, y que opcionalmente comprende instrucciones de uso de la preparación médica para tratar o prevenir el cáncer en el que el antígeno es un antígeno asociado a tumor.
- 20 7. La preparación médica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que es una composición farmacéutica, en la que, preferiblemente, la composición farmacéutica comprende además uno o más portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 25 8. La preparación médica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que IL2 es IL2 farmacocinética extendida (PK), en la que, preferiblemente, la IL2 de PK extendida comprende una proteína de fusión, la proteína de fusión comprende opcionalmente una fracción IL2 y una fracción seleccionada del grupo que consiste en albúmina sérica, un fragmento de inmunoglobulina, transferrina, Fn3 y variantes de los mismos.
9. La preparación médica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la citoquina adicional es una citoquina farmacocinética extendida (PK), en la que, preferiblemente, la citoquina de PK extendida comprende una proteína de fusión.
- 30 10. La preparación médica de la reivindicación 8 o 9, en la que la proteína de fusión comprende una fracción de citoquina y una fracción seleccionada del grupo que consiste en albúmina sérica, un fragmento de inmunoglobulina, transferrina, Fn3 y variantes de los mismos.
11. La preparación médica de la reivindicación 10, en la que la albúmina sérica comprende albúmina sérica de ratón o albúmina sérica humana.
- 35 12. La preparación médica de la reivindicación 10, en la que el fragmento de inmunoglobulina comprende un dominio Fc de inmunoglobulina.
13. La preparación médica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para uso farmacéutico.
14. La preparación médica de la reivindicación 13, en la que el uso farmacéutico comprende un tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad o trastorno.
- 40 15. La preparación médica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para uso en un método para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto, en el que el cáncer está asociado con la expresión o la expresión elevada de un antígeno asociado a un tumor.

Figura 1



B CLDN6-CAR-BBz-Luc-GFP

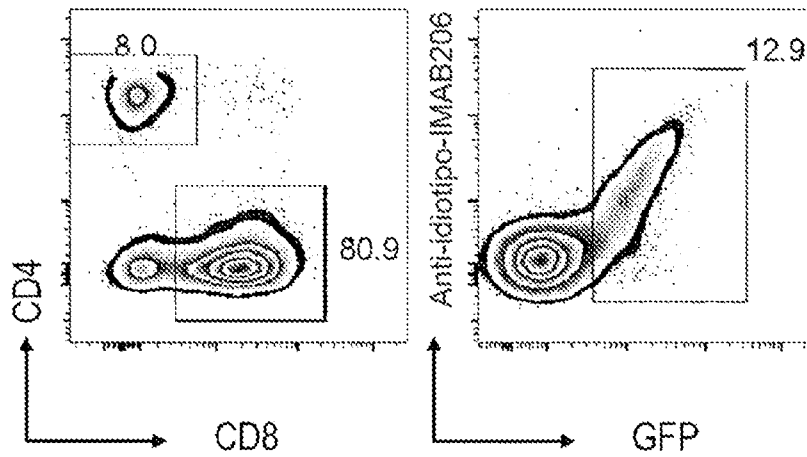


Figura 1C

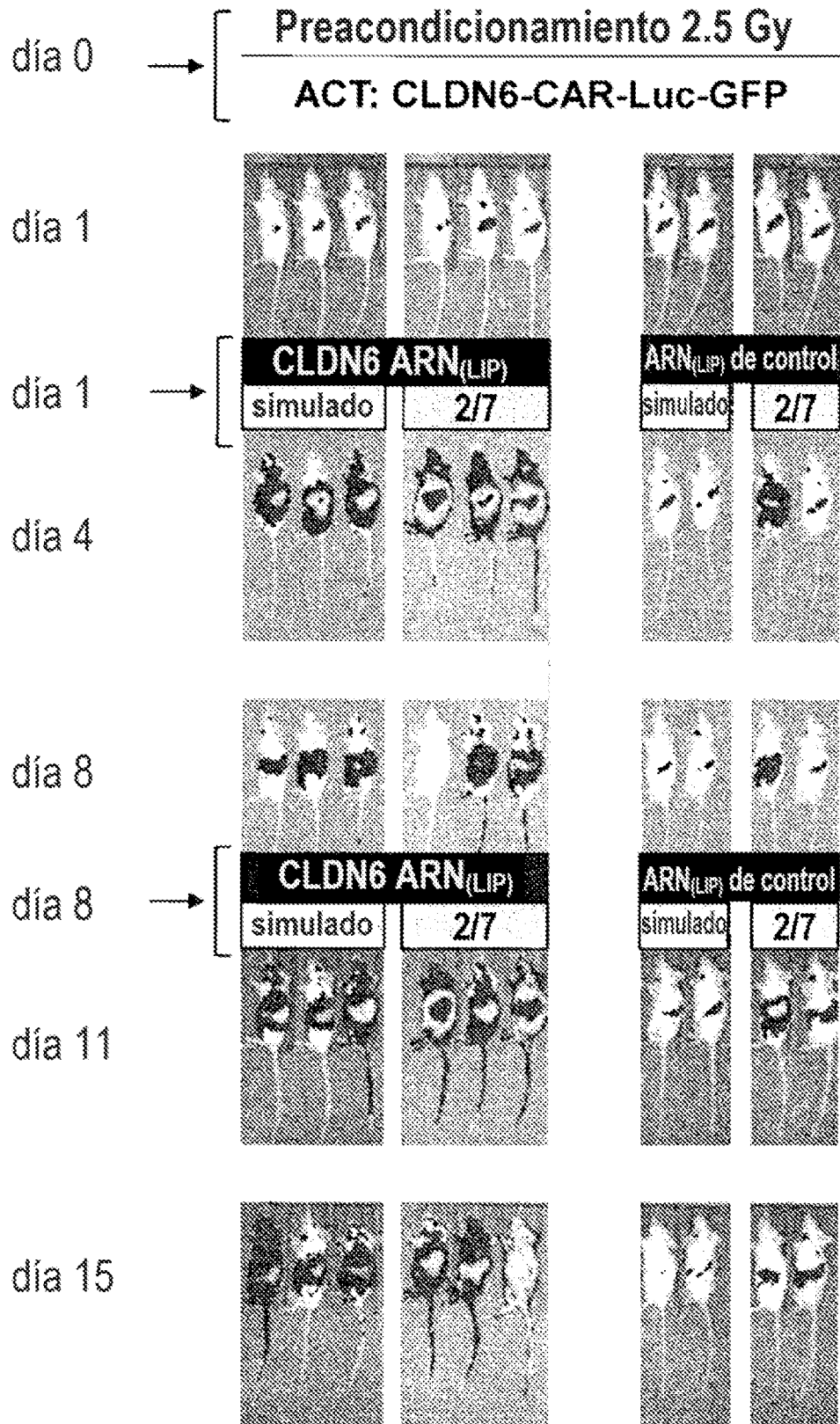


Figura 1D

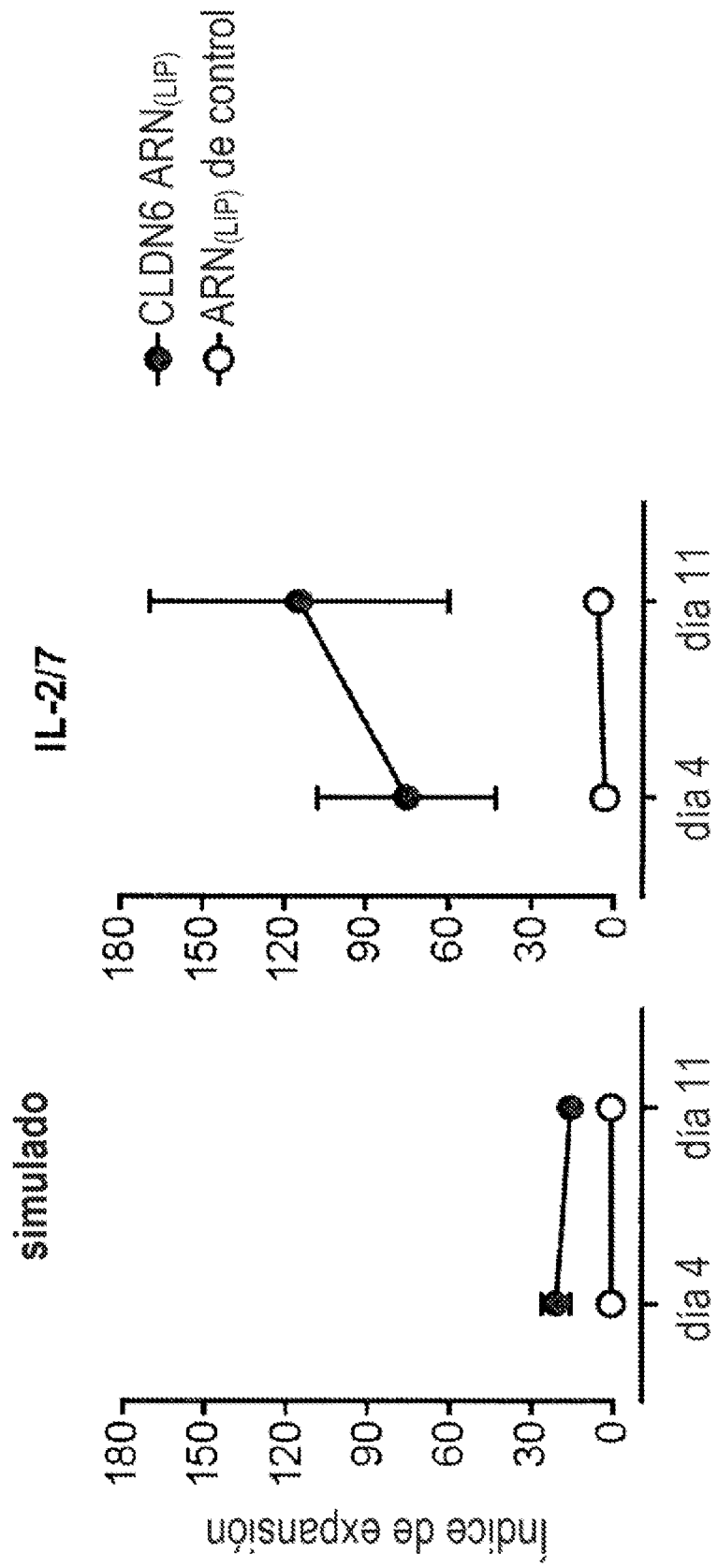


Figura 2A

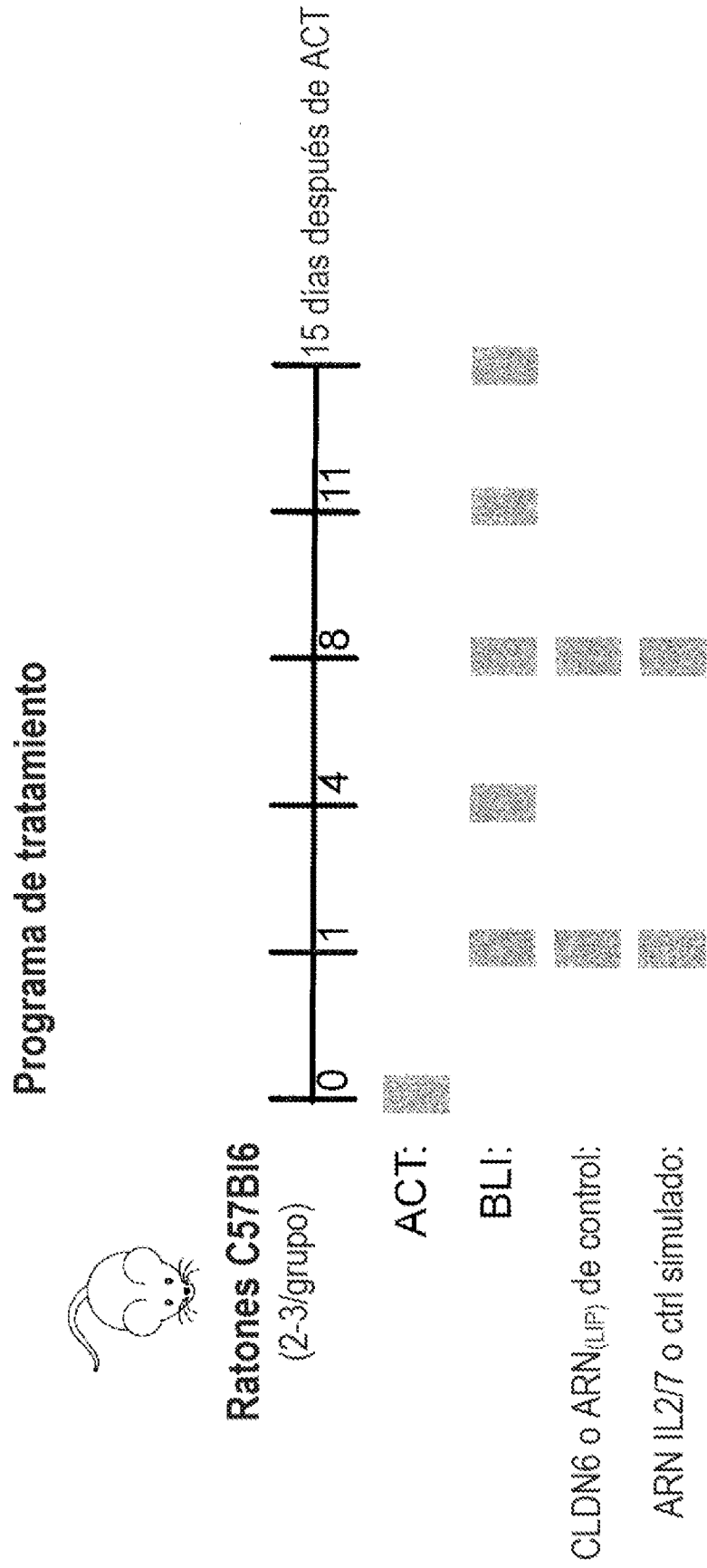


Figura 2B

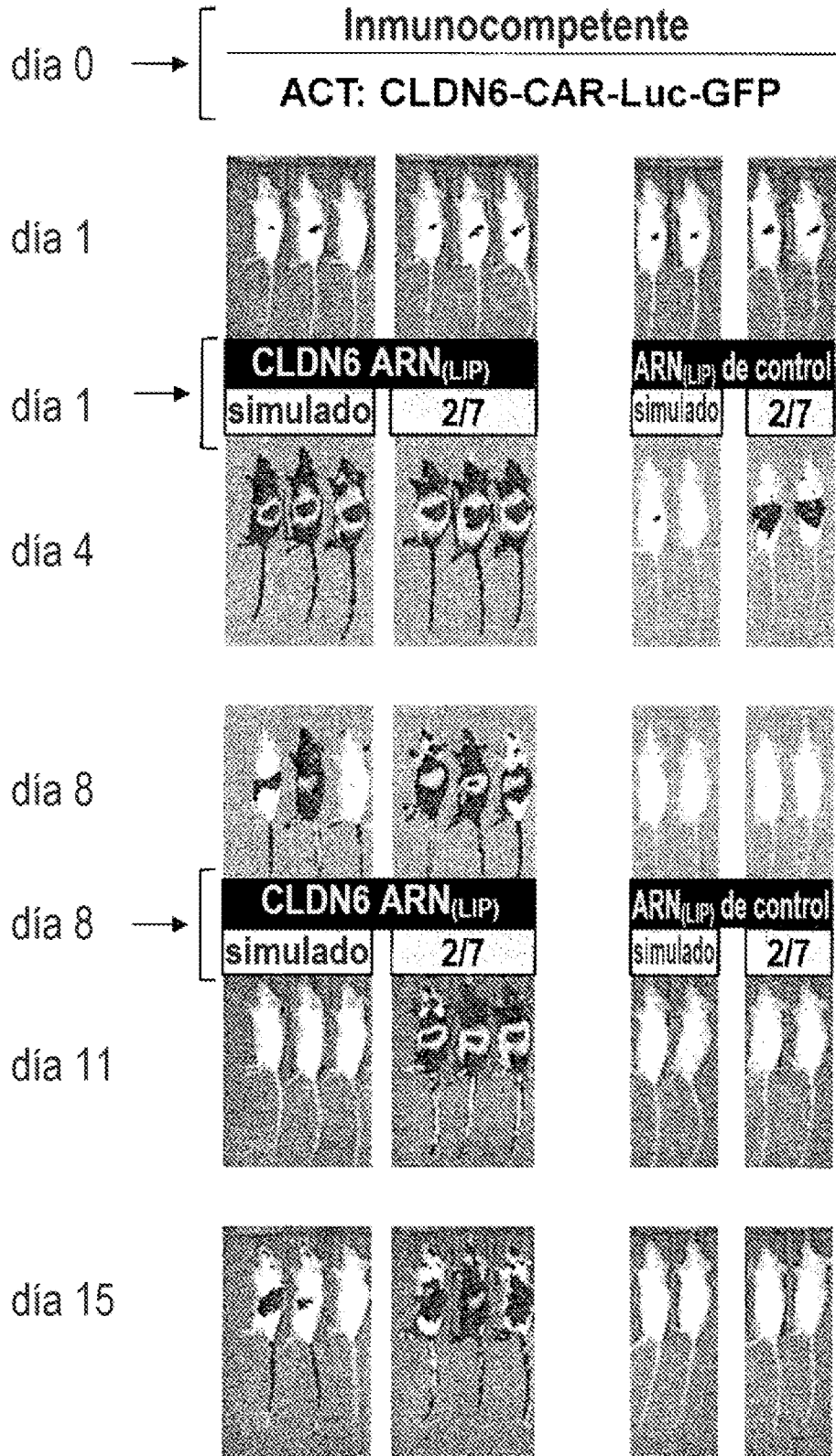


Figura 2C

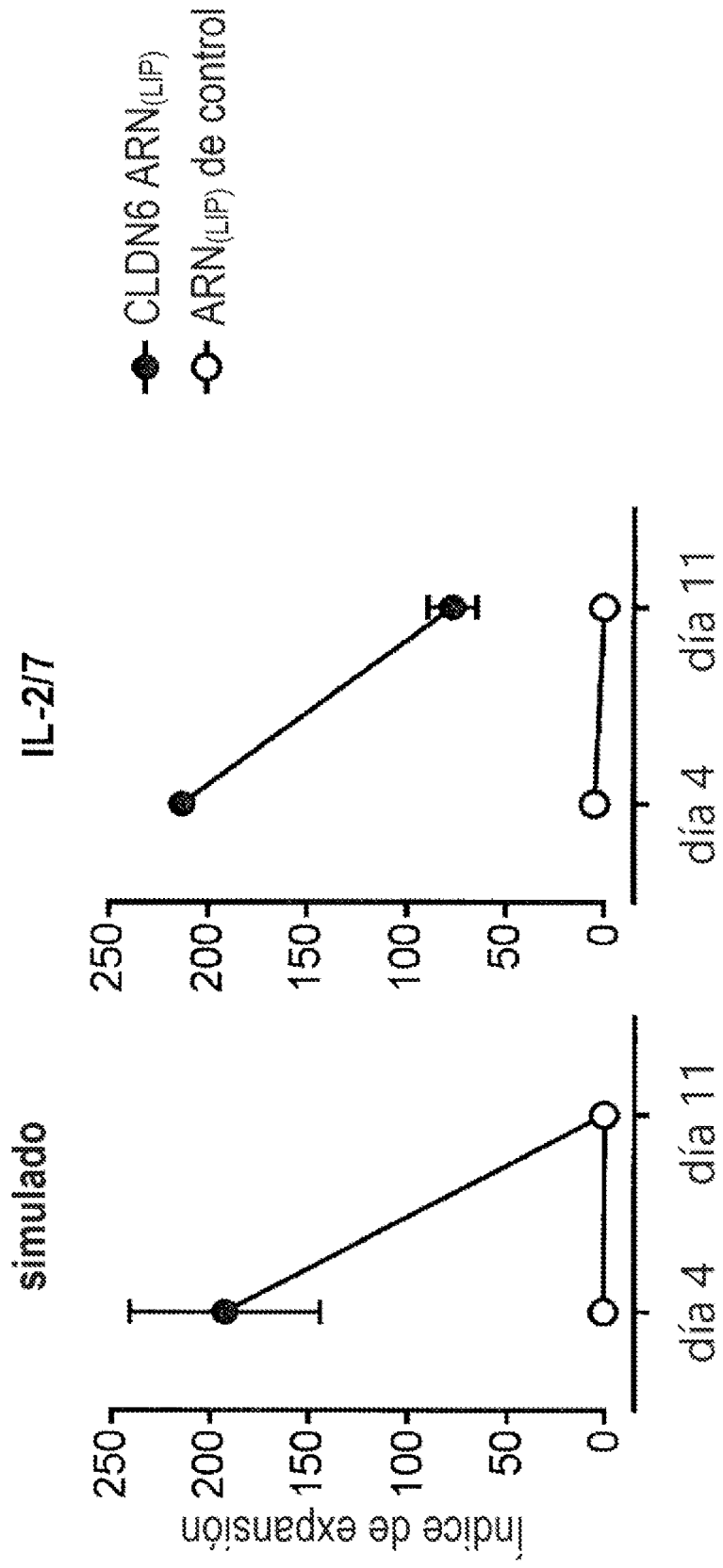
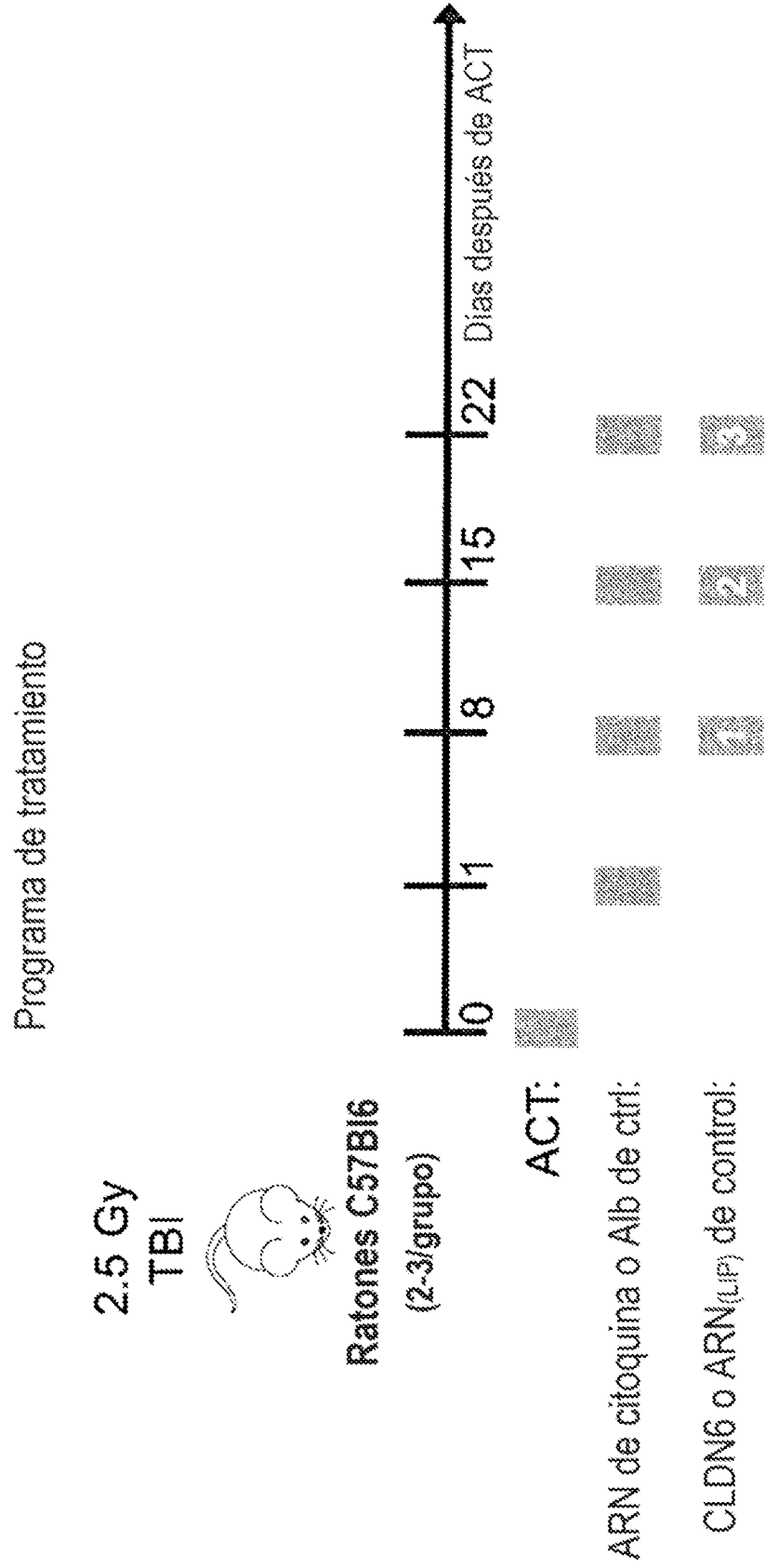


Figura 3A



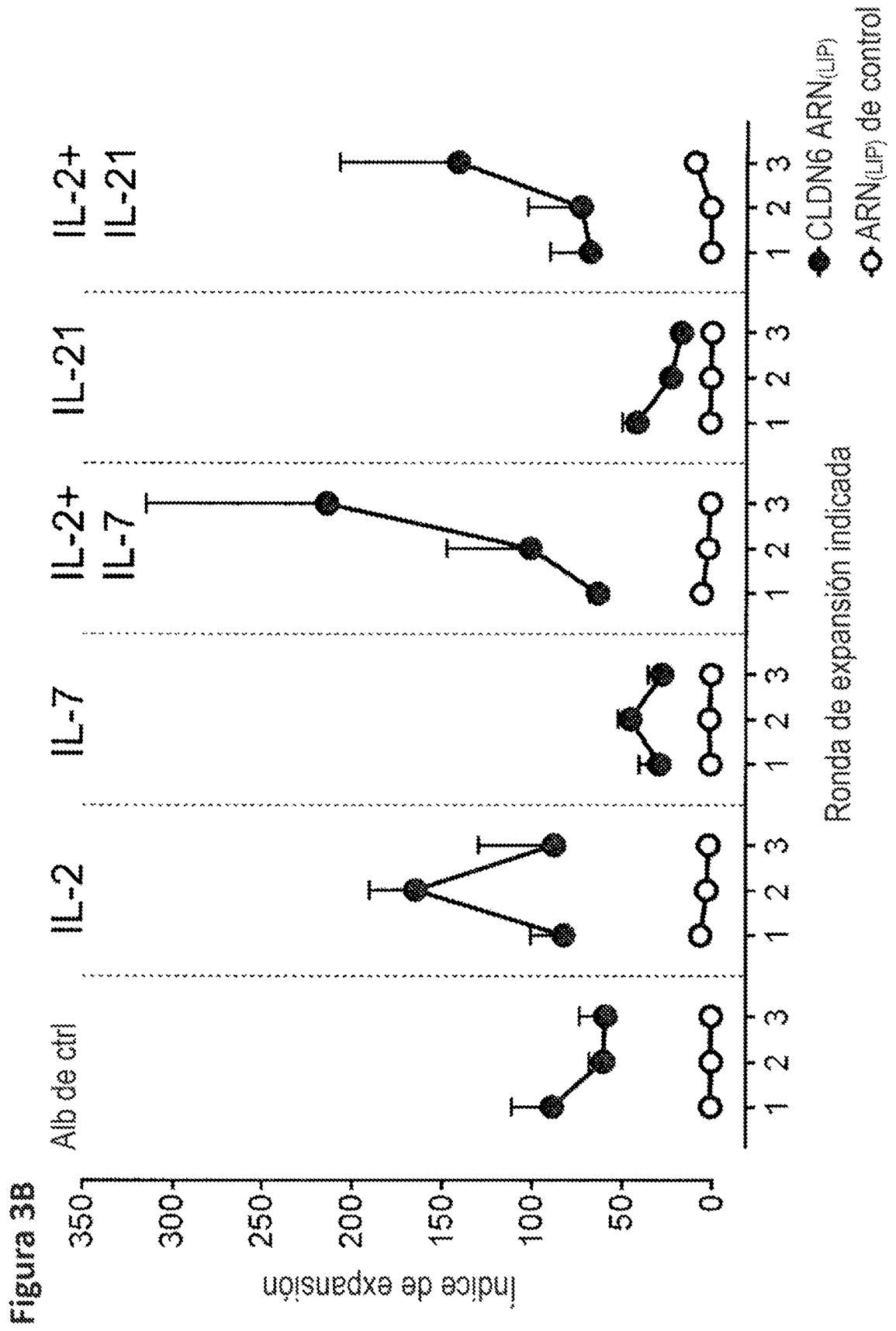


Figura 3

