

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 841 983**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783	(2010.01) A61P 31/14	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01) A61P 31/18	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01) A61P 31/20	(2006.01)
C07K 14/705	(2006.01) A61P 31/22	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01) A61P 33/00	(2006.01)
C07K 14/725	(2006.01) A61P 35/02	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01) A61P 37/04	(2006.01)
A61P 1/16	(2006.01) A61P 43/00	(2006.01)
A61P 31/00	(2006.01)	
A61P 31/12	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2012** **PCT/US2012/030388**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2012** **WO12129514**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2012** **E 12725893 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2020** **EP 2689010**

54 Título: **Método y composiciones para inmunoterapia celular**

30 Prioridad:

23.03.2011 US 201161466552 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.07.2021

73 Titular/es:

**FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH
CENTER (100.0%)
1100 Fairview Avenue N. M/S J6-200
Seattle, WA 98109-1024, US**

72 Inventor/es:

**RIDDELL, STANLEY, R. y
HUDECEK, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 841 983 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

Método y composiciones para inmunoterapia celular

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la biomedicina y específicamente a métodos útiles para la terapia del cáncer. En particular, las realizaciones de la invención se refieren a métodos y composiciones para llevar a cabo inmunoterapia celular.

10

Declaración con respecto a la investigación con fondos federales

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno en forma de subvenciones R01CA 18029 del Department of Health and Human Services de Estados Unidos, Beca SCORE del National Institute of Health and Leukemia and Lymphoma Society. El gobierno de Estados Unidos tiene determinados derechos sobre la invención.

15

Antecedentes de la invención

Estudios en roedores han demostrado que la inmunoterapia adoptiva con linfocitos T específicos de antígeno es eficaz para el cáncer y las infecciones, y hay evidencia de que esta modalidad tiene actividad terapéutica en seres humanos¹⁻⁸. Para aplicaciones clínicas, es necesario aislar linfocitos T de una especificidad de antígeno deseada o genomanipular linfocitos T para expresar receptores que se dirigen a células infectadas o transformadas, y luego expandir estas células en cultivo⁹⁻¹⁴. La transferencia de clones de linfocitos T es interesante porque permite control de especificidad y función, y facilita la evaluación de la persistencia, toxicidad y eficacia *in vivo*. Adicionalmente, en el contexto de trasplante alogénico de células madre, la administración a receptores de clones de linfocitos T del donante que se dirigen a patógenos o células malignas puede evitar la enfermedad injerto contra huésped que ocurre con la infusión de linfocitos T de donantes no seleccionados^{3,4,15}. Sin embargo, de los estudios clínicos se desprende que la eficacia de los linfocitos T cultivados, particularmente linfocitos T CD8⁺ clonados, está frecuentemente limitada por su falta de persistencia después de la transferencia adoptiva^{16,17}.

20

25

30

El conjunto de linfocitos del que pueden proceder los linfocitos T para inmunoterapia adoptiva contiene linfocitos T de memoria (T_M) que han estado en contacto previamente con antígenos indiferenciados y de larga duración. Los T_M se puede dividir además en subconjuntos de células de memoria central (T_{MC}) y memoria efectora (T_{ME}) que difieren en fenotipo, función y propiedades de migración dirigida¹⁸. Los T_{MC} CD8⁺ expresan CD62L y CCR7 en la superficie celular, que promueven la migración a los ganglios linfáticos y proliferan rápidamente si se vuelven a exponer al antígeno. Los T_{ME} CD8⁺ carecen de CD62L en la superficie celular y migran preferentemente a tejidos periféricos, y exhiben una función efectora inmediata¹⁹. En respuesta a la estimulación del antígeno, los T_{MC} y T_{ME} CD8⁺ se diferencian en linfocitos T efectores citolíticos (T_E) que expresan un alto nivel de grancimas y perforina, pero son de corta duración²⁰. Por lo tanto, la escasa supervivencia de los linfocitos T en ensayos clínicos de inmunoterapia puede deberse simplemente a su diferenciación durante el cultivo *in vitro* a T_E que están destinados a morir^{17,21,22}.

35

40

Cheadle *et al.* (2010) desarrollaron un CAR específico de CD-19 de ratón para investigar la eficacia antitumoral contra una línea celular de linfoma de linfocitos B singénicos en un contexto de linfocitos B del CD19⁺ normales del hospedador. *J Immunol.* Feb 15;184(4):1885-96.

45

Mitsuyasu *et al.* (2000) manipularon genéticamente linfocitos T CD4(+) y CD8(+) con especificidad del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) mediante la inserción de un gen, CD4zeta, que contiene el dominio extracelular de CD4 humano (que se une al env VIH) unido a la cadena zeta (zeta) del receptor de linfocitos T (que media la activación de los linfocitos T). Veinticuatro sujetos VIH positivos recibieron una sola infusión de 2 a 3 x 10¹⁰ linfocitos T CD4(+) y CD8(+) modificados con CD4zeta autólogos administrados con (n = 11) o sin (n = 13) interleucina 2 (IL-2). Los autores informan que la persistencia sostenida de alto nivel de linfocitos T genomodificados demuestra la viabilidad de la terapia génica de linfocitos T *ex vivo* en adultos infectados por VIH y sugiere la importancia de proporcionar una función auxiliar de T específica del VIH. *Blood.* Aug 1;96(3):785-93.

50

Hudecek *et al.* (2011) purificaron linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de la sangre periférica de donantes sanos (n = 3) y pacientes con CLL (n = 3) y los transdujeron con un vector lentivírico que codifica ROR1-CAR. Los autores concluyen que sus datos ilustran cómo las cualidades intrínsecas de las células pueden informar el diseño racional de productos celulares que contienen linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ específicos de tumor para mejorar resultados de inmunoterapia contra el cáncer. *Blood* 118:643.

60

Existe una necesidad de identificar poblaciones celulares y métodos que proporcionen una mayor supervivencia de los linfocitos T transferidos de forma adoptiva *in vivo*.

Sumario de la invención

65

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para conferir y/o aumentar respuestas inmunitarias mediadas por inmunoterapia celular, tal como mediante transferencia adoptiva de linfocitos T CD4+ modificados genéticamente específicos de tumor y específicos de subconjunto, en donde los linfocitos T CD4+ confieren y/o

5 aumentan la capacidad de los linfocitos T CD8+ para mantener la reactividad antitumoral y aumentar y/o maximizar la proliferación específica de tumores.

En una realización, la presente invención proporciona una composición de inmunoterapia celular adoptiva como se establece en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6. La invención también proporciona una composición para usar

10 en un tratamiento de inmunoterapia adoptiva del cáncer o una enfermedad infecciosa, como se establece en la reivindicación 7.

También se divulga en el presente documento un método para realizar inmunoterapia celular en un sujeto que padece una enfermedad o un trastorno mediante la administración al sujeto de una preparación celular de linfocitos T

15 citotóxicos modificados genéticamente que proporciona una respuesta inmunitaria celular, en donde la preparación celular de linfocitos T citotóxicos comprende linfocitos T CD8+ que tienen un receptor quimérico para antígeno con un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para un antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T u otros receptores, tales como dominios coestimuladores; y una preparación celular de linfocitos T auxiliares modificados genéticamente que exhibe un fenotipo

20 Th1 predominante y produce otras citocinas, provoca el reconocimiento directo de tumores y aumenta la capacidad de las preparaciones celulares de linfocitos T citotóxicos modificados genéticamente para mediar una respuesta inmunitaria celular, en donde la preparación celular de linfocitos T auxiliares comprende linfocitos T CD4+ que tienen un receptor quimérico para antígeno que comprende un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para el antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos

25 T. Son posibles varias modificaciones del método anterior. Por ejemplo, el receptor quimérico para antígeno que modifica el linfocito T CD4+ y el linfocito T CD8+ puede ser igual o diferente. En realizaciones alternativas, los linfocitos T se pueden modificar con un receptor de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés) recombinante. El TCR podría ser específico para cualquier antígeno, patógeno o tumor. Existen TCR para muchos antígenos tumorales en el melanoma (MART1, gp100, por ejemplo), leucemia (WT1, antígenos menores de histocompatibilidad, por ejemplo), cáncer de

30 mama (her2, NY-BR1, por ejemplo).

En el presente documento se proporciona una composición de inmunoterapia celular adoptiva que tiene una preparación celular de linfocitos T citotóxicos CD8+ modificados genéticamente que provoca una respuesta inmunitaria celular, en donde la preparación celular de linfocitos T citotóxicos comprende linfocitos T CD8+ que tienen un receptor

35 quimérico para antígeno con un anticuerpo de dominio variable extracelular específico para un antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T u otros receptores, tal como un dominio coestimulador, y una preparación celular de linfocitos T auxiliares modificados genéticamente que exhibe un fenotipo Th1 predominante y produce otras citocinas, provoca el reconocimiento directo de tumores y aumenta la capacidad de las preparaciones celulares de linfocitos T citotóxicos modificados genéticamente para

40 mediar una respuesta inmunitaria celular, en donde la preparación celular de linfocitos T auxiliares tiene linfocitos T CD4+ que tienen un receptor quimérico para antígeno con un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para el antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocito T.

En el presente documento se proporciona una composición de inmunoterapia celular adoptiva que tiene una preparación celular de linfocitos T citotóxicos CD8+ específicos de tumor modificados con receptores quiméricos para antígenos que provoca una respuesta inmunitaria celular, en donde la preparación celular de linfocitos T citotóxicos comprende linfocitos T CD8+ que tienen un receptor quimérico para antígeno que comprende un anticuerpo de cadena sencilla extracelular específico para un antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T, y linfocito T auxiliar CD4+ indiferenciado modificado con receptor quimérico para antígeno reactivo a antígeno que procede de linfocitos T CD45RO negativos, CD62L positivas CD4 positivas y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50

También se proporciona en el presente documento una composición de inmunoterapia celular adoptiva que tiene una preparación celular de linfocitos T citotóxicos CD8+ específicos de antígeno que provoca una respuesta inmunitaria celular que comprende linfocitos T CD8+ procedentes del paciente junto con un linfocito T auxiliar CD4+ modificado con receptor quimérico para antígeno reactivo a antígeno que provoca una respuesta de citocinas Th1 y aumenta la respuesta inmunitaria CD8+ a patógenos, en donde la preparación celular de linfocitos T auxiliares con linfocitos T CD4+ tiene un receptor quimérico para antígeno con un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para el antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocito

60 T.

En otra realización, en el presente documento se divulga una composición de inmunoterapia celular adoptiva con un linfocito T auxiliar CD4+ modificado con receptor quimérico para antígeno reactivo a antígeno que provoca el reconocimiento directo del tumor y aumenta la respuesta inmunitaria CD8+ a patógenos, en donde la preparación celular de linfocitos T auxiliares comprende linfocitos T CD4+ que tienen un receptor quimérico para antígeno que

65

comprende un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para un antígeno asociado a una enfermedad o un trastorno y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T.

En otro aspecto, en el presente documento se divulga un método para fabricar una composición de inmunoterapia adoptiva mediante la obtención de una preparación celular de linfocitos T citotóxicos CD8+ específicos de tumor modificados con receptores de antígenos quiméricos que provoca una respuesta inmunitaria celular y un receptor quimérico para antígeno reactivo a antígeno, en donde la preparación celular de linfocitos T citotóxicos modificados comprende linfocitos T CD8+ que tienen un receptor quimérico para antígeno con un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para un antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y un módulo de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T; y la obtención de un linfocito T auxiliar CD4+ indiferenciado modificado que provoca una respuesta de citocinas Th1, en donde la preparación celular de linfocitos T auxiliares modificados comprende linfocitos CD4+ que tienen un receptor quimérico para antígeno con un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para el antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T.

También se divulga en el presente documento un método para fabricar una composición de inmunoterapia adoptiva mediante la obtención de un linfocito T auxiliar CD4+ indiferenciado modificado que provoca una respuesta de citocinas Th1, en donde la preparación celular de linfocitos T auxiliares modificados comprende linfocitos T CD4+ que tienen un receptor quimérico para antígeno que comprende un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para el antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T, y la combinación del linfocito T auxiliar CD4+ indiferenciado modificado con una preparación celular de linfocitos T citotóxicos CD8+ de memoria central específicos de antígeno que tiene un receptor quimérico para antígeno con un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para el antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T u otros receptores.

También se divulga en el presente documento un método para realizar inmunoterapia celular en sujetos que padecen una enfermedad o un trastorno mediante la administración al sujeto de una preparación celular de linfocitos T auxiliares modificados genéticamente, en donde la preparación celular de linfocitos T auxiliares modificados comprende linfocitos T CD4+ que tienen un receptor quimérico para antígeno que comprende un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para un antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y un módulo de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T.

Estas y otras realizaciones de la divulgación se describen con más detalle en la memoria descriptiva, dibujos y reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1: muestra el fenotipo y análisis de la expresión del receptor quimérico para antígeno (CAR, por sus siglas en inglés) en una línea de linfocitos T CD8+ CAR transducida con lentivirus que codifica ROR1-CAR, y una no transducida como control. El casete ROR1-CAR contiene un EGFR truncado que sirve como marcador de transducción y puede detectarse mediante tinción con anticuerpos monoclonales anti-EGFR. La proteína de fusión Fc-ROR1 truncada se une directamente al dominio de unión a antígeno del ROR1-CAR y tiñe selectivamente la línea de linfocitos T transducida con ROR1-CAR pero no la no transducida de control. La expresión de ROR1-CAR en la superficie celular de linfocitos T CD8+ se mide directamente mediante la unión a la proteína de fusión ROR1-Fc e indirectamente mediante la expresión de un EGFR truncado que se codifica cadena abajo de una secuencia 2A en el vector.

La Figura 2: muestra actividad citolítica de linfocitos T CD8+ que expresan un receptor quimérico para antígeno específico de ROR1 contra un grupo de líneas celulares tumorales humanas ROR1 positivas (K562) y células tumorales primarias (B-CLL) y linfocitos B normales autólogos en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr. De acuerdo con la expresión uniforme de ROR1 en linfocitos B malignos pero no en linfocitos B normales maduros, los linfocitos T CD8+ ROR1-CAR modificados genéticamente solo lisaron células tumorales ROR1+ pero no linfocitos B normales maduros. Los linfocitos T CD8+ ROR1-CAR ejercen una actividad lítica específica contra células tumorales positivas para ROR1 incluyendo CLL primaria, pero no contra linfocitos B normales.

La Figura 3: muestra el fenotipo y la expresión de CAR de una línea de linfocitos T CD4+ transducida con ROR1-CAR y no transducida como control. La expresión del ROR1-CAR en la superficie celular de linfocitos T CD4+ se mide mediante la unión específica a la proteína de fusión ROR1-Fc. La proteína de fusión Fc ROR1 truncada, pero no la proteína Fc sola, se une directamente al ROR1-CAR y tiñe selectivamente la línea de linfocitos T CD4+ transducida con ROR1-CAR pero no la no transducida de control que confirma la expresión de ROR1-CAR en la superficie celular y la unión a la proteína ROR1. La expresión de ROR1-CAR en la superficie celular de linfocitos T CD4+ se mide mediante la unión específica a la proteína de fusión ROR1-Fc, pero no a una proteína de fusión Fc de control.

La Figura 4: (es decir, las Figuras 4A-4B, colectivamente) muestra la actividad citolítica débil pero específica de los linfocitos T CD4+ ROR1-CAR en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr contra un conjunto de células tumorales positivas para ROR1 incluyendo la CLL primaria, la línea de linfoma de células del manto Jeko-1, células K562 que se transfectaron de forma estable con ROR1 (K562/ROR1), pero no las células K562 naturales negativas para ROR1. Los linfocitos T CD4+ ROR1-CAR ejercen una actividad lítica débil pero específica contra las células

tumorales positivas para ROR1.

La Figura 5: (es decir, las Figuras 5A-5B, colectivamente) muestra los resultados de un ELISA de IFN γ (Figura 5A) y un ensayo de citocinas múltiple (Figura 5B). Secreción de citocinas de líneas de linfocitos T CD4+ y CD8+ ROR1-CAR. Se incubaron conjuntamente linfocitos T CD4+ ROR1-CAR y CD8 ROR1-CAR con células tumorales ROR1+, y se midieron los niveles de interferón gamma (IFN γ) mediante ELISA (5A), y se midieron IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17 mediante un ensayo Luminex (5B). Los linfocitos T CD4+ modificados con ROR1-CAR reconocen específicamente células tumorales positivas para ROR1 y líneas de células tumorales y producen cantidades más altas de citocinas Th1 incluyendo IFN- γ , TNF- α y particularmente IL-2 que los linfocitos T CD8+ ROR1-CAR modificados. Estos datos demuestran que los linfocitos T CD4+ ROR1-CAR ejercen funciones efectoras auxiliares después de la estimulación a través de ROR1-CAR y además de mediar la reactividad antitumoral directa, también podrían utilizarse para aumentar la capacidad de los linfocitos T CD8+ modificados con ROR1-CAR para mediar una respuesta inmunitaria celular.

La Figura 6 muestra los resultados de un estudio de proliferación que muestra que se induce la proliferación de linfocitos T CD4+ ROR1-CAR después de la estimulación con líneas de células tumorales positivas para ROR1 y células tumorales primarias (ensayo CFSE) y que tanto el porcentaje de células en proliferación como el número de divisiones celulares que experimentó el subconjunto proliferante fueron significativamente mayores en comparación con los linfocitos T CD8+ modificados con ROR1-CAR. Los linfocitos T CD4+ ROR1-CAR proliferan más vigorosamente después de la estimulación con células tumorales positivas para ROR1 (K562/ROR1, CLL primaria y Jeko MCL) en comparación con los CTL CD8+ ROR1-CAR.

Figura 7: Los linfocitos T CD4+ ROR1 CAR policlonales no seleccionados proporcionan ayuda a los CTL CD8+ ROR1-CAR al promover su proliferación en respuesta al tumor. Los linfocitos T CD4+ ROR1-CAR (procedentes de linfocitos T CD4+ en masa) aumentaron significativamente la proliferación de CTL CD8+ ROR1-CAR policlonales no seleccionados (18 % en cultivo individual $\rightarrow$ 31,5 % después de cultivo conjunto con linfocitos T CD4+ CAR).

La Figura 8: (es decir, las FIGURAS 8A-8D, colectivamente) muestra la generación de líneas de linfocitos T CD4+ CAR a partir de subconjuntos de CD4+ indiferenciados, de memoria central y de memoria efectora purificados por clasificación de flujo y el análisis de la función de los linfocitos T. El perfil de citocinas y la capacidad proliferativa sugieren que los linfocitos T CD4+ ROR1-CAR procedentes de linfocitos T CD4+ indiferenciados pueden ser los más adecuadas para proporcionar ayuda a los CTL CD8+. Se obtuvieron datos similares en experimentos que comparan la función de líneas de linfocitos T CD4+ CAR que expresan un CAR específico de CD19. La Figura 8A muestra la purificación por clasificación de flujo de linfocitos T CD4+ indiferenciados, de memoria central y efectora basados en la expresión de CD45RA, CD45RO, CD62L. La Figura 8B muestra el análisis de la proliferación de las líneas de linfocitos T ROR1-CAR que procedían mediante transducción lentivírica de linfocitos T CD4+ indiferenciados, de memoria central y efectora purificados por clasificación (ensayo CFSE). La Figura 8C muestra el análisis de secreción de citocinas de líneas de linfocitos T ROR1-CAR a partir de linfocitos T CD4+ indiferenciados, de memoria central y efectora purificados por clasificación (ensayo Luminex). La Figura 8D muestra el análisis de secreción de citocinas de líneas de linfocitos T CD19-CAR a partir de linfocitos T CD4+ indiferenciados, de memoria central y efectora purificados por clasificación (ensayo Luminex). El perfil de citocinas obtenido mediante análisis de citocinas múltiple (Figura 8B) y la capacidad proliferativa mediante tinción CFSE (Figura 8C) muestra que los linfocitos T CD4+ modificados con ROR1-CAR procedentes del subconjunto indiferenciado produjeron los niveles más altos de citocinas Th1 y proliferaron más vigorosamente después estimulación con células tumorales positivas para ROR1, sugiriendo que pueden ser más adecuados para aumentar los CTL CD8+ ROR1-CAR. El análisis de secreción de citocinas de líneas de linfocitos T CD19-CAR a partir de linfocitos T CD4+ indiferenciados, de memoria central y efectora purificados por clasificación (ensayo Luminex), demuestra que la actividad de los subconjuntos de linfocitos T CD4 se puede generalizar a muchos CAR.

La Figura 9: muestra el cultivo conjunto de linfocitos T CD8+ modificados con ROR1-CAR con linfocitos T CD4+ modificados con ROR1-CAR (pero no linfocitos T CD4+ no transducidos de control). Cultivo conjunto de CTL CD8+ ROR1-CAR y líneas de linfocitos T CD4+ ROR1-CAR procedentes de subconjuntos indiferenciados, de memoria central y efectora para definir la combinación óptima de linfocitos T CD8+ y CD4+ que permitirían la máxima proliferación de CTL CD8+ ROR1-CAR. Los linfocitos T CD4 indiferenciados ROR1-CAR proporcionan la mayor proliferación de CTL CD8 de memoria central ROR1-CAR. El cultivo conjunto conduce a un aumento en la proliferación específica de tumor del subconjunto CD8+, y esa proliferación máxima del subconjunto CD8+ se observa después del cultivo conjunto con linfocitos T CD4+ ROR1-CAR procedentes de linfocitos T CD4+ indiferenciados, demostrando que indiferenciado

La Figura 10: muestra la capacidad superior de líneas de linfocitos T CD4+ CAR procedentes del subconjunto indiferenciado para aumentar la proliferación específica de tumor de CTL CD8+ CAR procedentes de memoria central en experimentos de cultivos conjuntos con CTL CD8+ CD19-CAR y líneas de linfocitos T CD4+ CD19-CAR, estimulados con la línea tumoral de linfoma de células del manto CD19+ Jeko-1. La capacidad superior de líneas de linfocitos T CD4+ CAR procedentes del subconjunto indiferenciado para aumentar la proliferación específica de tumor de CTL CD8+ CAR procedentes de memoria central se confirmó en experimentos de cultivos conjuntos con CTL CD8+ CD19-CAR y líneas de linfocitos T CD4+ CD19-CAR, estimulados con la línea tumoral de linfoma de células del manto CD19+ Jeko-1.

La Figura 11: muestra que los linfocitos T CD8+ CAR y los linfocitos T CD4+ CAR confieren independientemente eficacia antitumoral directa en un modelo de linfoma en ratones inmunodeficientes (NOD/SCID-Raji). Se inocularon grupos de ratones (n = 3) con luciferasa de luciérnaga que expresaba células tumorales Raji mediante inyección en la vena de la cola y se trataron con una dosis única de 10×10^6 linfocitos T. Los ratones recibieron linfocitos T

procedentes de CD8+ de memoria central transducidos con CD19-CAR o transducidos de forma simulada de control (A) o procedentes de CD4+ indiferenciados transducidos con CD19-CAR o transducidos de forma simulada de control (B). La carga y distribución tumoral se analizaron utilizando imágenes de bioluminiscencia en serie.

La Figura 12: muestra el aumento y el efecto sinérgico de linfocitos T CD4+ modificados con ROR1-CAR sobre la eficacia antitumoral de los CTL CD8+ ROR1-CAR en un modelo tumoral de ratón de linfoma de células del manto sistémico (NSG/Jeko-1-ffLuc). Eficacia antitumoral de linfocitos T CD8+ y CD4+ modificados con ROR1-CAR en un modelo tumoral de ratón de linfoma de células del manto sistémico agresivo (NSG/Jeko-1). Análisis de la carga tumoral mediante imágenes de bioluminiscencia después de la transferencia adoptiva de CTL CD8+ ROR1-CAR, linfocitos T CD4+ ROR1-CAR o una combinación de linfocitos T CD8+ y CD4+ ROR1-CAR. Todos los ratones recibieron la misma dosis total de linfocitos T CAR.

La Figura 13: muestra la sinergia de linfocitos T CD8+ y CD4+ CD19-CAR en un modelo de linfoma sistémico de ratón (NSG/Raji). Se inocularon ratones NSG con células tumorales Raji transducidas con luciferasa de luciérnaga. El injerto del tumor Raji se confirmó mediante formación de imágenes de bioluminiscencia el día 6 después de la inoculación del tumor (antes del tratamiento) (esquema de tratamiento mostrado en A, injerto de tumor mediante bioluminiscencia mostrado en B). A continuación, se trataron grupos de ratones (n = 5) con linfocitos T CD8+ modificados con CD19-CAR o con un producto de linfocitos T combinado que contenía linfocitos T CD8+ y CD4+ CD19-CAR. Todos los ratones recibieron la misma dosis total de linfocitos T (10×10^6). El análisis de la carga tumoral utilizando imágenes de bioluminiscencia mostró la erradicación completa de los tumores Raji en las cohortes de ratones tratados con linfocitos T CD8+ CD19-CAR, y en ratones tratados con el producto combinado de linfocitos T CD8+ y CD4+ CD19-CAR (después del tratamiento, medio, barras negras y grises) B). A continuación, los ratones se expusieron a un segundo inóculo de células tumorales Raji y se analizó la frecuencia de linfocitos T CD4+ y CD8+ CAR en la sangre periférica, y el injerto tumoral. En ratones tratados con un producto combinado de linfocitos T CD8+ y CD4+ CAR, niveles significativamente más altos de linfocitos T CD8+ CAR después de la exposición tumoral (C, paneles inferiores) y rechazo completo del inóculo de Raji (después de la exposición tumoral, barra gris derecha, B). Por el contrario, en ratones que habían recibido CTL CD8+ CD19-CAR solo, no se detectó un aumento en linfocitos T CAR después de la exposición tumoral (C) y las células tumorales Raji pudieron injertarse (después de la exposición tumoral, barra negra derecha, panel B).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

"Células T" o "linfocitos T" como se usa en el presente documento pueden ser de cualquier especie de mamífero, preferentemente primate, incluyendo monos, perros y seres humanos. En algunas realizaciones, los linfocitos T son alogénicos (de la misma especie pero de diferente donante) que el sujeto receptor; en algunas realizaciones, los linfocitos T son autólogos (el donante y el receptor son el mismo); en algunas realizaciones, los linfocitos T son singénicos (el donante y los receptores son diferentes pero son gemelos idénticos).

Linfocito T citotóxico (CTL, por sus siglas en inglés), como se usa en el presente documento, se refiere a un linfocito T que expresa CD8 en la superficie del mismo (es decir, un linfocito T CD8+). En algunas realizaciones, dichas células son preferentemente linfocitos T de "memoria" (linfocitos T_M) que han estado en contacto previamente con antígenos.

Linfocitos T de "memoria central" (o "T_{MC}") como se usa en el presente documento se refiere a un CTL que ha estado en contacto previamente con antígenos que expresa CD62L y CD45RO en la superficie del mismo, y no expresa o tiene una expresión disminuida de CD45RA en comparación con células indiferenciadas. En realizaciones, las células de memoria central son positivas para la expresión de CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO y CD95, y tienen una expresión disminuida de CD54RA en comparación con células indiferenciadas.

Linfocitos T de "memoria efectora" (o "T_{ME}") como se usa en el presente documento se refiere a un CTL que ha estado en contacto previamente con antígenos que no expresa o tiene una expresión disminuida de CD62L en la superficie del mismo en comparación con células de memoria central, y no expresa o tiene una expresión disminuida de CD45RA en comparación con una célula indiferenciada. En realizaciones, las células de memoria efectora son negativas para la expresión CD62L, CCR7, CD28, CD45RA, y son positivas para CD127 en comparación con células indiferenciadas o células de memoria central.

Los linfocitos T "indiferenciados", como se usan en el presente documento, se refieren a un linfocito T que no ha estado en contacto previamente con antígenos que expresa CD62L y CD45RA, y no expresa o tiene una expresión disminuida de CD45RO, en comparación con células de memoria central. En algunas realizaciones, los linfocitos T CD8+ indiferenciados se caracterizan por la expresión de marcadores fenotípicos de linfocitos T indiferenciados, incluyendo CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 y CD45RA.

Los linfocitos T "efectores", "T_E", como se usa en el presente documento, se refieren a células de linfocitos T citotóxicos que han estado en contacto previamente con antígenos que no expresan o tienen una expresión disminuida de CD62L, CCR7, CD28, y son positivos para grancima B y perforina en comparación con células de memoria central.

"Enriquecido" y "agotado" como se usa en el presente documento para describir cantidades de tipos de células en una mezcla se refiere a someter la mezcla de las células a un proceso o etapa que da como resultado un aumento en el número del tipo "enriquecido" y una disminución en el número de las células "agotadas". Por lo tanto, dependiendo de

la fuente de la población original de células sometidas al proceso de enriquecimiento, una mezcla o composición puede contener 60, 70, 80, 90, 95 o 99 por ciento o más (en número o recuento) de las células "enriquecidas" y 40, 30, 20, 10, 5 o 1 por ciento o menos (en número o recuento) de las células "agotadas".

5 La interleucina 15 es conocida y se describe en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 6.344.192.

"CAR" como se usa en el presente documento se refiere a un receptor quimérico para antígeno que comprende un dominio variable extracelular de un anticuerpo específico para un antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T u otros receptores, tales como un dominio coestimulador.

Modos de la divulgación

15 Los linfocitos T CD4+ durante el cultivo *in vitro* aumentan significativamente la proliferación, persistencia y reactividad antitumoral de linfocitos T CD8+ específicos de tumor *in vitro* e *in vivo*. En algunas realizaciones, los linfocitos T CD4+ indiferenciados poseen una programación intrínseca que conduce a una actividad auxiliar superior en comparación con linfocitos T CD4+ procedentes de linfocitos T CD4+ de memoria central y efectora, o en masa.

20 En realizaciones, los linfocitos T CD4+ reactivos a tumores se modifican con un receptor quimérico para antígeno (CAR) procedente de un anticuerpo monocatenario específico para el receptor de tirosina cinasa huérfano ROR1 o para la molécula CD19. ROR1 se expresa uniformemente en la leucemia linfocítica crónica (CLL, por sus siglas en inglés) y el linfoma de células del manto (MCL, por sus siglas en inglés) y el CAR específico para ROR1 de un anticuerpo monoclonal (AcM) anti-ROR1 confiere reconocimiento específico de linfocitos B malignos pero no de linfocitos B normales maduros cuando se expresan en linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+. Los linfocitos T ROR1-CAR de linfocitos T CD4+ de memoria central y efectora en masa y purificados por clasificación de flujo indiferenciados se obtienen de la sangre periférica tanto de donantes sanos como de pacientes con CLL. Los linfocitos T CD4+ CAR tenían una actividad citolítica específica pero débil contra tumores ROR1+ incluyendo CLL primaria, las células Jeko-1 de la línea MCL y K562 transfectadas con ROR1. El análisis de citocinas múltiple detecta una producción de alto nivel de citocinas Th1 con niveles significativamente más altos de IFN γ , TNF α , y particularmente IL-2 en comparación con los CTL CD8+ CAR. La tinción CFSE muestra una proliferación considerablemente mayor después de la estimulación con células tumorales positivas para ROR1, con el porcentaje de células que se indujo a proliferar y el número de divisiones celulares que experimentó el subconjunto proliferante en comparación con CTL CD8+ CAR. Los linfocitos T CD4+ obtenidos tanto de donantes sanos como de pacientes con CLL adquieren reactividad antitumoral después de la modificación genética con un CAR específico para ROR1. Asimismo, la capacidad de proliferar en ausencia de citocinas exógenas y de producir altos niveles de citocinas Th1 demuestra que los linfocitos T CD4+ CAR ejercen funciones auxiliares normales después de la estimulación a través del CAR y sugiere que, además de conferir efectos antitumorales directos, podrían utilizarse para aumentar los CTL CD8+ específicos de tumor.

40 Se obtiene el perfil de citocinas y la capacidad proliferativa de linfocitos T ROR1-CAR procedentes de subconjuntos CD4+ indiferenciados, de memoria central y efectora purificados por clasificación de flujo. Los linfocitos T CD4+ CAR, procedentes del subconjunto CD45RA+ CD45RO-CD62L+ indiferenciado, producen los niveles más altos de citocinas Th1, especialmente IL-2, y proliferan en respuesta a células tumorales ROR1+. De hecho, en experimentos de cultivo conjunto, la adición de linfocitos T CD4+ transducidos con CAR pero no los no transducidos conduce a un aumento significativo en la proliferación específica de tumor de CTL CD8+ CAR. En algunas realizaciones, los linfocitos T CD4+ modificados con CAR procedentes de linfocitos T CD4+ indiferenciados en lugar de subconjuntos de memoria central y efectora o en masa dan como resultado una mayor proliferación de CTL CD8+ CAR.

50 Los linfocitos T CD8+ de memoria central tienen una programación intrínseca que les permite persistir durante períodos prolongados después de la administración, lo que los convierte en el subconjunto preferido de linfocitos T CD8+ para inmunoterapia. En realizaciones, los CTL modificados con ROR1-CAR o CD19 CAR a partir de linfocitos T CD8+ de memoria central purificados por clasificación y linfocitos T CD4+ indiferenciados modificados con CAR proporcionan una mayor proliferación del subconjunto de linfocitos T CD8+. En realizaciones, los linfocitos T CD4+ específicos de tumor ejercen una reactividad antitumoral y proporcionan ayuda a los linfocitos T CD8+ específicos de tumor *in vitro* e *in vivo*. En una realización específica, se utilizan linfocitos T CD4+ específicos de tumor del subconjunto indiferenciado.

55 En otra realización, los linfocitos T CD8+ y CD4+ se pueden modificar con un receptor de linfocitos T (TCR). El TCR podría ser específico para cualquier antígeno, patógeno o tumor (hay TCR para muchos antígenos tumorales en el melanoma (MART1, gp100 por ejemplo), leucemia (WT1, antígenos menores de histocompatibilidad, por ejemplo), cáncer de mama (her2, NY-BR1 por ejemplo).

Descripción detallada

Composiciones

65 La divulgación proporciona una composición de inmunoterapia celular adoptiva que comprende una preparación celular de linfocitos T auxiliares modificados genéticamente que aumenta la capacidad de las preparaciones celulares

de linfocitos T citotóxicos modificados genéticamente para mediar una respuesta inmunitaria celular, en donde la preparación celular de linfocitos T auxiliares comprende linfocitos T CD4+ que tienen un receptor quimérico para antígeno que comprende un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para el antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T u otros receptores.

La composición de inmunoterapia celular adoptiva comprende además una preparación celular de linfocitos T citotóxicos CD8+ específicos de tumor modificados con receptores quiméricos para antígenos que provoca una respuesta inmunitaria celular, en donde la preparación celular de linfocitos T citotóxicos comprende linfocitos T CD8+ que tienen un receptor quimérico para antígeno que comprende un anticuerpo de cadena sencilla extracelular específico para un antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T.

En algunas realizaciones, una composición de inmunoterapia celular adoptiva comprende una preparación celular de linfocitos T citotóxicos CD8+ específicos de tumor modificados con receptores quiméricos para antígenos que provoca una respuesta inmunitaria celular, en donde la preparación celular de linfocitos T citotóxicos comprende linfocitos T CD8+ que tienen un receptor quimérico para antígeno que comprende un anticuerpo de cadena sencilla extracelular específico para un antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T, en combinación con un linfocito T CD4+ auxiliar indiferenciado modificado con receptor quimérico para antígeno reactivo a antígeno procedente de linfocitos T negativos para CD45RO, positivos para CD62L positivos para CD4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En el presente documento se divulga una composición de inmunoterapia celular adoptiva que comprende una preparación de linfocitos T citotóxicos CD8+ específicos de antígeno que provoca una respuesta inmunitaria celular procedente del paciente combinada con un linfocito T CD4+ auxiliar indiferenciado modificado con receptor quimérico para antígeno reactivo a antígeno que aumenta la respuesta inmunitaria de CD8+, en donde la preparación celular de linfocitos T auxiliares comprende linfocitos T CD4+ que tienen un receptor quimérico para antígeno que comprende un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para el antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T.

La composición de inmunoterapia celular adoptiva comprende un linfocito T CD4+ auxiliar indiferenciado modificado con receptor quimérico para antígeno reactivo a antígeno que aumenta la respuesta inmunitaria de CD8+, en donde la preparación celular de linfocitos T auxiliares comprende linfocitos T CD4+ que tienen un receptor quimérico para antígeno que comprende un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para un antígeno asociado a una enfermedad o un trastorno y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T.

En los ejemplos, la célula linfocito T CD4+ auxiliar se selecciona del grupo que consiste en linfocitos T CD4+ indiferenciados, linfocitos T CD4+ de memoria central, linfocitos T CD4+ de memoria efectora, o linfocitos T CD4+ en masa. En algunas realizaciones, la célula linfocito CD4+ auxiliar es un linfocito T CD4+ indiferenciado, en donde el linfocito T CD4+ indiferenciado comprende un linfocito T CD4+ CD45RO-, CD45RA+, CD62L+ ilustrativo. En los ejemplos, la célula linfocito T citotóxico CD8+ se selecciona del grupo que consiste en linfocitos T CD8+ indiferenciados, linfocitos T CD8+ de memoria central, linfocitos T CD8+ de memoria efectora o linfocitos T CD8+ en masa. En algunas realizaciones, la célula linfocito T citotóxico CD8+ es un linfocito T de memoria central en donde el linfocito T de memoria central comprende un linfocito T CD8+ CD45RO+, CD62L+. En otras realizaciones más, la célula linfocito T citotóxico CD8+ es un linfocito T de memoria central y la célula linfocito T CD4+ auxiliar es un linfocito T CD4+ indiferenciado.

En realizaciones alternativas, los linfocitos T se pueden modificar con un receptor de linfocitos T recombinante. El TCR podría ser específico para cualquier antígeno, patógeno o tumor. Existen TCR para muchos antígenos tumorales en el melanoma (MART1, gp100, por ejemplo), leucemia (WT1, antígenos menores de histocompatibilidad, por ejemplo), cáncer de mama (her2, NY-BR1, por ejemplo).

Selección y clasificación de poblaciones de linfocitos T

Las composiciones descritas en el presente documento proporcionan linfocitos T CD4+ y CD8+ reactivos a antígenos.

Los linfocitos T pueden recolectarse de acuerdo con técnicas conocidas y enriquecerse o agotarse mediante técnicas conocidas tales como unión por afinidad a anticuerpos tales como citometría de flujo y/o selección inmunomagnética. Después de las etapas de enriquecimiento y/o agotamiento, la expansión *in vitro* de los linfocitos T deseados se puede llevar a cabo de acuerdo con técnicas conocidas (incluyendo, pero sin limitación, las descritas en la Patente de Estados Unidos N.º 6.040.177 de Riddell *et al.*), o variaciones de las mismas que resultarán evidentes para los expertos en la materia.

Por ejemplo, la población o subpoblación de linfocitos T deseada se puede expandir mediante la adición de una población de linfocitos T inicial a un medio de cultivo *in vitro*, y luego añadir al medio de cultivo células alimentadoras, tales como células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) que no se dividen, (por ejemplo, de manera que la población de células resultante contenga al menos aproximadamente 5, 10, 20 o 40 o más

- células alimentadoras PBMC por cada linfocito T en la población inicial que se va a expandir); e incubar el cultivo (por ejemplo, durante un tiempo suficiente para expandir el número de linfocitos T). Las células alimentadoras que no se dividen pueden comprender células alimentadoras PBMC irradiadas con rayos gamma. En algunas realizaciones, las PBMC se irradian con rayos gamma en el intervalo de aproximadamente 3000 a 3600 rads. El orden de adición de los linfocitos T y las células alimentadoras al medio de cultivo se puede invertir si se desea. El cultivo se puede incubar normalmente en condiciones de temperatura y similares que sean adecuadas para el crecimiento de linfocitos T. Para el crecimiento de linfocitos T humanos, por ejemplo, la temperatura será generalmente de al menos aproximadamente 25 grados Celsius, preferentemente al menos aproximadamente de 30 grados, más preferentemente aproximadamente de 37 grados.
- Los linfocitos T expandidos incluyen linfocitos T citotóxicos (CTL) y linfocitos T auxiliares que son específicos para un antígeno presente en un tumor humano o patógeno.
- Opcionalmente, el método de expansión puede comprender además la etapa de añadir células linfoblastoides (LCL, por sus siglas en inglés) transformadas con EBV que no se dividen como células alimentadoras. Las LCL se pueden irradiar con rayos gamma en el intervalo de aproximadamente 6000 a 10.000 rads. Las células de alimentación LCL se pueden proporcionar en cualquier cantidad adecuada, tal como una proporción de células alimentadoras LCL a linfocitos T iniciales de al menos aproximadamente 10:1.
- Opcionalmente, el método de expansión puede comprender además la etapa de añadir anticuerpo monoclonal anti-CD3 al medio de cultivo (por ejemplo, a una concentración de al menos aproximadamente 0,5 ng/ml). Opcionalmente, el método de expansión puede comprender además la etapa de añadir IL-2 y/o IL-15 al medio de cultivo (*por ejemplo*, en donde la concentración de IL-2 es al menos aproximadamente 10 unidades/ml).
- Después del aislamiento de los linfocitos T, tanto los linfocitos T citotóxicos como los auxiliares, se pueden clasificar en subpoblaciones de linfocitos T indiferenciados, de memoria y efectores antes o después de la expansión.
- Los linfocitos CD8+ se pueden obtener mediante métodos estándar. En algunas realizaciones, los linfocitos CD8+ se clasifican en linfocitos indiferenciados, de memoria central y efectora mediante la identificación de los antígenos de la superficie celular que están asociados a cada uno de esos tipos de linfocitos CD8+. En realizaciones, los linfocitos T de memoria están presentes en los subconjuntos CD62L+ y CD62L- de linfocitos CD8+ de sangre periférica. Las PBMC se clasifican en fracciones CD62L-CD8+ y CD62L+CD8+ después de la tinción con anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L. En algunas realizaciones, la expresión de marcadores fenotípicos de TCM de memoria central incluye CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 y CD127 y son negativos para grancima B. En algunas realizaciones, los linfocitos T de memoria central son linfocitos T CD45RO+, CD62L+, CD8+. En algunas realizaciones, T_E efectores son negativos para CD62L, CCR7, CD28 y CD127, y positivos para grancima B y perforina. En algunas realizaciones, los linfocitos T CD8+ indiferenciados se caracterizan por la expresión de marcadores fenotípicos de linfocitos T indiferenciados, incluyendo CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 y CD45RA.
- Si una célula o población de células es positiva para un marcador de superficie celular particular puede determinarse mediante citometría de flujo usando tinción con un anticuerpo específico para el marcador de superficie y un anticuerpo de control de isotipo coincidente. Una población celular negativa para un marcador se refiere a la ausencia de tinción significativa de la población celular con el anticuerpo específico frente al control de isotipo, positiva se refiere a una tinción uniforme de la población celular frente al control de isotipo. En algunas realizaciones, una disminución en la expresión de uno o marcadores se refiere a la pérdida de 1 log₁₀ en la intensidad media de fluorescencia y/o disminución del porcentaje de células que exhiben el marcador de al menos un 20 % de las células, 25 % de las células, 30 % de las células, 35 % de las células, 40 % de las células, 45 % de las células, 50 % de las células, 55 % de las células, 60 % de las células, 65 % de las células, 70 % de las células, 75 % de las células, 80 % de las células, 85 % de las células, 90 % de las células, 95 % de las células y 100 % de las células y cualquier % entre el 20 y el 100 % en comparación con una población celular de referencia. En algunas realizaciones, una población celular positiva para uno o varios marcadores se refiere a un porcentaje de células que exhiben el marcador de al menos un 50 % de las células, 55 % de las células, 60 % de las células, 65 % de las células, 70 % de las células, 75 % de las células, 80 % de las células, 85 % de las células, 90 % de las células, 95 % de las células y 100 % de las células y cualquier % entre el 50 y el 100 % en comparación con una población celular de referencia.
- Los linfocitos T CD4+ auxiliares se clasifican en células indiferenciadas, de memoria central y efectoras mediante la identificación de poblaciones celulares que tienen antígenos de superficie celular. Los linfocitos CD4+ se pueden obtener mediante métodos convencionales. En algunas realizaciones, los linfocitos T CD4+ indiferenciados son linfocitos T CD4+ CD45RO-, CD45RA+, CD62L+. En algunas realizaciones, los linfocitos CD4+ de memoria central son positivos para CD62L y positivos para CD45RO. En algunas realizaciones, los linfocitos CD4+ efectores son negativos para CD62L y CD45RO.
- Las poblaciones de CD4+ y CD8+ que son específicas de antígeno pueden obtenerse mediante estimulación de linfocitos T indiferenciados o específicos de antígeno con antígeno. Por ejemplo, se pueden generar clones de linfocitos T específicos de antígeno para antígenos de citomegalovirus aislando linfocitos T de sujetos infectados y estimulando las células *in vitro* con el mismo antígeno. También se pueden utilizar linfocitos T indiferenciados. Se pueden utilizar

cualquier cantidad de antígenos de células tumorales, células cancerosas o agentes infecciosos. Ejemplos de dichos antígenos incluyen antígenos del VIH, antígenos HCV, antígenos HBV, antígenos CMV, antígenos parasitarios y antígenos tumorales tales como el receptor huérfano de tirosina cinasa ROR1, tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, mesotelina y CEA. En algunas realizaciones, las composiciones de inmunoterapia celular adoptiva son útiles en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno incluyendo un tumor sólido, neoplasias hematológicas, melanoma o infección con un virus.

Modificación de poblaciones de linfocitos T

En algunas realizaciones, puede desearse introducir genes funcionales en los linfocitos T para usar en inmunoterapia de acuerdo con la presente divulgación. Por ejemplo, el gen o genes introducidos pueden mejorar la eficacia de la terapia promoviendo la viabilidad y/o función de los linfocitos T transferidos; o pueden proporcionar un marcador genético para permitir la selección y/o evaluación de supervivencia o migración *in vivo*; o pueden incorporar funciones que mejoran la seguridad de la inmunoterapia, por ejemplo, haciendo que la célula sea susceptible a la selección negativa *in vivo* tal como lo describe Lupton S. D. *et al.*, Mol. and Cell Biol., 11:6 (1991); y Riddell *et al.*, Human Gene Therapy 3:319-338 (1992); véanse también las publicaciones WO1192/008796 y WO1994/028143 de Lupton *et al.* que describen el uso de genes de fusión seleccionables bifuncionales obtenidos de la fusión de un marcador seleccionable positivo dominante con un marcador seleccionable negativo. Esto se puede llevar a cabo de acuerdo con técnicas conocidas (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 6.040.177 de Riddell *et al.* en las columnas 14-17) o variaciones de las mismas que serán evidentes para los expertos en la materia basándose en la presente divulgación.

Los linfocitos T se modifican con receptores de antígenos quiméricos (CAR). En algunas realizaciones, los CAR comprenden un fragmento de anticuerpo monocatenario (scFv) que procede de las cadenas pesada variable (VH, por sus siglas en inglés) y ligera variable (VL, por sus siglas en inglés) de un anticuerpo monoclonal (AcM) unido a la cadena del TCR CD3+ que media la activación y citotoxicidad de los linfocitos T. Las señales coestimuladoras también se pueden proporcionar a través del CAR mediante la fusión del dominio coestimulador de CD28 o 4-1BB a la cadena CD3+. Los CAR son específicos para moléculas de la superficie celular independientes de HLA, superando así las limitaciones del reconocimiento de TCR, incluyendo la restricción de HLA y los niveles bajos de expresión de HLA en células tumorales.

Los CAR se pueden construir con una especificidad para cualquier marcador de superficie celular mediante la utilización de fragmentos de unión a antígeno o dominios variables de anticuerpos de, por ejemplo, moléculas de anticuerpo. Las moléculas de unión a antígeno se pueden unir a uno o más módulos de señalización celular. En realizaciones, los módulos de señalización celular incluyen el dominio transmembrana de CD3, los dominios de señalización intracelular de CD3 y los dominios transmembrana de CD28. En realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio transmembrana de CD28 y un dominio de señalización unido a un dominio intracelular de CD3. En algunas realizaciones, un CAR también puede incluir un marcador de transducción tal como tEGFR.

En realizaciones, el dominio de señalización intracelular de los linfocitos T citotóxicos CD8+ es el mismo que el dominio de señalización intracelular de los linfocitos T CD4+ auxiliares.

En otras realizaciones, el dominio de señalización intracelular de los linfocitos T citotóxicos CD8+ es diferente al dominio de señalización intracelular de los linfocitos T CD4+ auxiliares.

En algunas realizaciones, el linfocito T CD8+ y el linfocito T CD4+ están modificados genéticamente con un dominio de cadena pesada de anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de superficie celular específico de patógeno. En realizaciones, los CAR son específicos para antígenos expresados en la superficie celular asociados a patógenos, tumores o células cancerosas. En algunas realizaciones, un CAR es específico para antígenos del VIH, antígenos HCV, antígenos HBV, antígenos CMV, antígenos parasitarios y antígenos tumorales tales como el receptor huérfano de tirosina cinasa ROR1, tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, mesotelina y CEA. Los métodos para producir un CAR se describen en el presente documento y también se pueden encontrar en el documento 6.410.319 de Forman y en los documentos WO 2002/077029, 7.446.191, 2010/065818, 2010/025177, 2007/059298 y 7.514.537 de Jensen. *et al.* y como lo describe Berger C. *et al.*, J. Clinical Investigation, 118:1 294-308 (2008).

En realizaciones, se puede introducir el mismo CAR o uno diferente en cada uno de los linfocitos T CD4+ y CD8+. En realizaciones, el CAR en cada uno de estas poblaciones tiene una molécula de unión a antígeno que se une específicamente al mismo antígeno. Los módulos de señalización celular pueden diferir. En realizaciones, cada uno de los linfocitos T CD4 o CD8 puede clasificarse en células indiferenciadas, de memoria central, de memoria efectora o efectoras antes de la transducción. En realizaciones alternativas, cada uno de los linfocitos T CD4 o CD8 puede clasificarse en células indiferenciadas, de memoria central, de memoria efectora o efectoras antes de la transducción.

En realizaciones alternativas, los linfocitos T se pueden modificar con un receptor de linfocitos T recombinante. El TCR podría ser específico para cualquier antígeno, patógeno o tumor. Existen TCR para muchos antígenos tumorales en el melanoma (MART1, gp100 por ejemplo), leucemia (WT1, antígenos menores de histocompatibilidad, por ejemplo), cáncer de mama (her2, NY-BR1 por ejemplo).

Se han desarrollado varias técnicas de infección que utilizan partículas víricas infecciosas recombinantes para la administración de genes. Esto representa un enfoque actualmente preferido para la transducción de linfocitos T de la presente invención. Los vectores víricos que se han utilizado de esta manera incluyen vectores víricos procedentes del virus de simio 40, adenovirus, virus adenoasociado (AAV, por sus siglas en inglés), vectores lentivíricos y retrovirus. Por lo tanto, los métodos de transferencia y expresión de genes son numerosos, pero funcionan esencialmente para introducir y expresar material genético en células de mamíferos. Varias de las técnicas anteriores se han utilizado para transducir células hematopoyéticas o linfoides, incluyendo la transfección con fosfato de calcio, fusión de protoplastos, electroporación e infección con adenovirus recombinante, vectores de virus y retrovirus adenoasociados. Los linfocitos T primarios se han transducido con éxito mediante electroporación y mediante infección retroviral.

Los vectores retrovíricos proporcionan un método muy eficaz para la transferencia de genes a células eucariotas. Asimismo, la integración retroviral tiene lugar de forma controlada y da como resultado la integración estable de una o unas pocas copias de la nueva información genética por célula.

Se contempla que la sobreexpresión de un factor estimulante (por ejemplo, una linfocina o una citocina) puede ser tóxica para el individuo tratado. Por lo tanto, está dentro del alcance de la invención incluir segmentos génicos que hacen que los linfocitos T de la invención sean susceptibles a la selección negativa *in vivo*. Por "selección negativa" se entiende que la célula infundida puede eliminarse como resultado de un cambio en la afección del individuo *in vivo*. El fenotipo seleccionable negativo puede ser resultado de la inserción de un gen que confiere sensibilidad a un agente administrado, por ejemplo, un compuesto. Los genes seleccionables negativos se conocen en la materia e incluyen, entre otros, lo siguiente: el gen de la timidina cinasa del virus del herpes simple tipo I (HSV-I TK, por sus siglas en inglés) (Wigler *et al.*, Cell 11:223, 1977) que confiere sensibilidad al ganciclovir; el gen de la hipoxantina fosforribosiltransferasa celular (HPRT), el gen de la adenina fosforribosiltransferasa celular (APRT), citosina desaminasa bacteriana, (Mullen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:33 (1992)).

En algunos ejemplos puede resultar útil incluir en los linfocitos T un marcador positivo que permita la selección de células del fenotipo seleccionable negativo. *in vitro*. El marcador seleccionable positivo puede ser un gen que, al ser introducido en la célula hospedadora expresa un fenotipo dominante que permite la selección positiva de células portadoras del gen. Los genes de este tipo son conocidos en la materia e incluyen, entre otros, el gen de la higromicina-B fosfotransferasa (hph) que confiere resistencia a la higromicina B, el gen de la aminoglucósido fosfotransferasa (neo o aph) de Tn5 que codifica para la resistencia al antibiótico G418, el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR), el gen de la adenosina daminasa (ADA) y el gen de resistencia a múltiples fármacos (MDR).

Preferentemente, el marcador seleccionable positivo y el elemento seleccionable negativo están unidos de tal manera que la pérdida del elemento seleccionable negativo necesariamente va acompañada de la pérdida del marcador seleccionable positivo. Aún más preferentemente, los marcadores seleccionables positivo y negativo se fusionan de modo que la pérdida de uno conduce obligatoriamente a la pérdida del otro. Un ejemplo de un polinucleótido fusionado que produce como producto de expresión un polipéptido que confiere las características de selección tanto positivas como negativas deseadas descritas anteriormente es un gen de fusión de higromicina fosfotransferasa timidina cinasa (HyTK). La expresión de este gen produce un polipéptido que confiere resistencia a higromicina B para selección positiva *in vitro* y sensibilidad a ganciclovir para la selección negativa *in vivo*. Véase Lupton S. D., *et al.*, Mol. and Cell. Biology examples 11:3374-3378, 1991. Además, en ejemplos preferidos, los polinucleótidos que codifican los receptores quiméricos están en vectores retrovíricos que contienen el gen fusionado, particularmente aquellos que confieren resistencia a higromicina B para la selección positiva *in vitro* y sensibilidad a ganciclovir para selección negativa *in vivo*, por ejemplo, el vector retroviral HyTK descrito en Lupton, S. D. *et al.* (1991), *supra*. Véanse también las publicaciones de los documentos WO 1992/008796 y WO 1994/28143, por S. D. Lupton, que describe el uso de genes de fusión seleccionables bifuncionales procedentes de la fusión de marcadores seleccionables positivos dominantes con marcadores seleccionables negativos.

Los marcadores seleccionables positivos preferidos proceden de genes seleccionados del grupo que consiste en hph, nco y gpt, y los marcadores seleccionables negativos preferidos proceden de genes seleccionados del grupo que consiste en citosina desaminasa, HSV-I TK, VZV TK, HPRT, APRT y gpt. Los marcadores especialmente preferidos son genes de fusión seleccionables bifuncionales en donde el marcador seleccionable positivo procede de hph o neo, y el marcador seleccionable negativo procede de citosina desaminasa o un gen TK o marcador seleccionable.

Se pueden emplear varios métodos para transducir linfocitos T, como se sabe bien en la materia. Por ejemplo, las transducciones retrovíricas se pueden llevar a cabo de la siguiente manera: el día 1 después de la estimulación usando REM como se describe en el presente documento, proporcionar a las células 20-30 unidades/ml de IL-2; el día 3, reemplazar la mitad del medio con sobrenadante retroviral preparado de acuerdo con métodos estándar y luego complementar los cultivos con 5 µg/ml de polibreno y 20-30 unidades/ml de IL-2; el día 4, lavar las células y colocarlas luego en medio de cultivo fresco complementado con 20-30 unidades/ml de IL-2; el día 5, repetir la exposición a retrovirus; el día 6, colocar las células en medio selectivo (que contiene, por ejemplo, un antibiótico correspondiente a un gen de resistencia a antibióticos proporcionado en el vector retroviral) complementado con 30 unidades/ml de IL-2; el día 13, separar las células viables de las células muertas utilizando la separación por gradiente de densidad Ficoll Hypaque y luego subclonar las células viables.

Los linfocitos CD4+ y CD8+ se pueden modificar con un vector de expresión que codifica un CAR. En realizaciones, estas células luego se clasifican adicionalmente en subpoblaciones de células indiferenciadas, de memoria central y efectoras como se describió anteriormente mediante la clasificación de antígenos de superficie celular únicos para cada una de esas poblaciones de células. Además, las poblaciones de linfocitos CD4+ o CD8+ pueden seleccionarse por su perfil de citocinas o actividades proliferativas. Por ejemplo, se pueden seleccionar linfocitos T CD4+ que tienen una producción mejorada de citocinas tales como IL-2, IL-4, IL-10, TNF α e IFN γ y en comparación con células transducidas simuladas o linfocitos CD8+ transducidos cuando se estimulan con antígeno. En otras realizaciones, se seleccionan linfocitos T CD4+ indiferenciados que tienen una producción mejorada de IL-2 y/o TNF α . Asimismo, se seleccionan linfocitos CD8+ que tienen una producción mejorada de IFN γ en comparación con linfocitos CD8+ transducidos simulados.

En realizaciones, se seleccionan linfocitos CD4+ y CD8+ que proliferan en respuesta al antígeno. Por ejemplo, se seleccionan linfocitos CD4+ que proliferan vigorosamente cuando se estimulan con antígeno en comparación con células transducidas simuladas o linfocitos CD8+ transducidos.

En algunas realizaciones, se seleccionan linfocitos CD4+ y CD8+ que son citotóxicos para las células portadoras de antígenos. En realizaciones, se espera que CD4+ sean débilmente citotóxicos en comparación con linfocitos CD8+.

La divulgación contempla que se utilizarán combinaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ en las composiciones. En una realización, las combinaciones de linfocitos CD4+ transducidos con CAR pueden combinarse con linfocitos CD8+ reactivos a antígeno con la misma especificidad antigénica que el CAR. En otras realizaciones, los linfocitos CD8+ transducidos con CAR se combinan con linfocitos CD4+ reactivos a antígeno. En otra realización más, se combinan linfocitos CD4+ y CD8+ modificados con CAR.

Como se describe en el presente documento, la divulgación contempla que los linfocitos CD4+ y CD8+ se puedan separar en subpoblaciones, tales como poblaciones de células indiferenciadas, de memoria central y efectora. Como se describe en el presente documento, en algunas realizaciones, los linfocitos CD4+ indiferenciados son linfocitos T CD4+ CD45RO-, CD45RA+, CD62L+. En algunas realizaciones, los linfocitos CD4+ de memoria central son positivos para CD62L y positivos para CD45RO. En algunas realizaciones, los linfocitos CD4+ efectores son negativos para CD62L y positivos para CD45RO. Cada una de estas poblaciones puede modificarse independientemente con un CAR.

Como se describe en el presente documento, en realizaciones, los linfocitos T de memoria están presentes en los subconjuntos CD62L+ y CD62L- de linfocitos CD8+ de sangre periférica. Las PBMC se clasifican en fracciones CD62L- CD8+ y CD62L+CD8+ después de la tinción con anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L. En algunas realizaciones, la expresión de marcadores fenotípicos de la TCM de memoria central incluye CD62L, CCR7, CD28, CD3 y CD127 y son negativos para grancima B. En algunas realizaciones, los linfocitos T de memoria central son linfocitos T CD45RO+, CD62L+, CD8+. En algunas realizaciones, T_E efectores son negativos para CD62L, CCR7, CD28 y CD127, y positivos para grancima B y perforina. En algunas realizaciones, los linfocitos T CD8+ indiferenciados se caracterizan por CD8+, CD62L+, CD45RO+, CCR7+, CD28+ CD127+ y CD45RO+. Cada una de estas poblaciones puede modificarse independientemente con un CAR.

Cada una de las subpoblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+ se puede combinar entre sí. En una realización específica, los linfocitos CD4+ indiferenciados modificados se combinan con linfocitos T CD8+ de memoria central modificados para proporcionar un efecto citotóxico sinérgico en células portadoras de antígenos, tales como células tumorales.

Métodos.

La divulgación proporciona métodos para preparar composiciones de inmunoterapia adoptiva y usos de estas composiciones para realizar inmunoterapia celular en un sujeto que padece una enfermedad o un trastorno.

En el presente documento se divulga un método de fabricación de las composiciones que comprende obtener un linfocito T CD4+ auxiliar indiferenciado modificado, en donde la preparación celular de linfocitos T auxiliares modificados comprende linfocitos T CD4+ que tienen un receptor quimérico para antígeno que comprende un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para el antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y un dominio de señalización intracelular.

En otro ejemplo, un método comprende además obtener un linfocito T citotóxico CD8+ modificado, en donde la preparación celular de linfocitos T citotóxicos modificados comprende linfocitos CD8+ que tienen un receptor quimérico para antígeno que comprende un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para el antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T.

En otro ejemplo, un método comprende obtener un linfocito T citotóxico CD8+ modificado, en donde la preparación celular de linfocitos T citotóxicos modificados comprende linfocitos T CD8+ que tienen un receptor quimérico para antígeno que comprende un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para el antígeno asociado a la

enfermedad o al trastorno y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T, y que además comprende combinar los linfocitos T citotóxicos CD8+ modificados con una preparación celular de linfocitos de linfocitos CD4+ auxiliares específicos de antígeno.

La preparación de los linfocitos CD4+ y CD8+ que se modifican con un CAR se ha descrito anteriormente, así como en los ejemplos. Los linfocitos T específicos de antígeno pueden obtenerse de un paciente que tiene la enfermedad o el trastorno o pueden prepararse mediante estimulación *in vitro* de linfocitos T en presencia de antígeno. Las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ también pueden aislarse como se describe en el presente documento y combinarse en los métodos de fabricación.

Se divulgan métodos para realizar inmunoterapia celular en un sujeto que padece una enfermedad o un trastorno que comprenden: administrar una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13. En otros ejemplos, un método comprende administrar al sujeto una preparación celular de linfocitos T citotóxicos modificados genéticamente que proporciona una respuesta inmunitaria celular, en donde la preparación celular de linfocitos T citotóxicos comprende linfocitos T CD8+ que tienen un receptor quimérico para antígeno que comprende un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para un antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T u otros receptores y una preparación celular de linfocitos T auxiliares modificados genéticamente que provoca el reconocimiento directo de tumores y aumenta la capacidad de las preparaciones celulares de linfocitos T citotóxicos modificados genéticamente para mediar una respuesta inmunitaria celular, en donde la preparación celular de linfocitos T auxiliares comprende linfocitos T CD4+ que tienen un receptor quimérico para antígeno que comprende un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para el antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T.

En otro ejemplo, un método para realizar inmunoterapia celular en un sujeto que tiene una enfermedad o un trastorno comprende administrar al sujeto una preparación celular de linfocitos T auxiliares modificados genéticamente, en donde la preparación celular de linfocitos T auxiliares modificados comprende linfocitos T CD4+ que tienen un receptor quimérico para antígeno que comprende un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para un antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y un módulo de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T. En una realización, el método comprende además administrar al sujeto una preparación celular de linfocitos T citotóxicos modificados genéticamente, en donde la preparación de linfocitos T citotóxicos modificados comprende células positivas para CD8 que tienen un receptor quimérico para antígeno que comprende un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para el antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y un módulo de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T.

Otro ejemplo describe un método para realizar inmunoterapia celular en un sujeto que padece una enfermedad o un trastorno que comprende: analizar una muestra biológica del sujeto para detectar la presencia de un antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno y administrar las composiciones de inmunoterapia adoptiva descritas en el presente documento, en donde el receptor quimérico para antígeno se une específicamente al antígeno.

Se produce un CAR que tiene un componente que proporciona una unión específica a un antígeno asociado a una enfermedad o una afección, tal como un tumor sólido, cáncer, infección vírica y una infección con un parásito. En realizaciones, el módulo de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T del receptor quimérico para antígeno comprende un dominio transmembrana, un dominio de señalización de CD28 y un dominio de señalización intracelular de CD3 u otros dominios de moléculas coestimuladoras de linfocitos T. En algunas realizaciones, la molécula de señalización intracelular comprende el dominio intracelular de CD3, un dominio de CD28, un dominio transmembrana y de señalización de CD28 unido a un dominio intracelular de CD3, u otros dominios de moléculas coestimuladoras de linfocitos T.

En realizaciones alternativas, los linfocitos T se pueden modificar con un receptor de linfocitos T recombinante. El TCR podría ser específico para cualquier antígeno, patógeno o tumor. Existen TCR para muchos antígenos tumorales en el melanoma (MART1, gp100 por ejemplo), leucemia (WT1, antígenos menores de histocompatibilidad, por ejemplo), cáncer de mama (her2, NY-BR1 por ejemplo).

En algunos ejemplos, el linfocito T CD4+ auxiliar se selecciona del grupo que consiste en linfocitos T CD4+ indiferenciados, linfocitos T CD4+ de memoria central, linfocitos T CD4+ de memoria efectora o linfocitos T CD4+ en masa. En una realización específica, la célula linfocito CD4+ auxiliar es un linfocito T CD4+ indiferenciado, en donde el linfocito T CD4+ indiferenciado comprende un linfocito T CD4+ CD45RO-, CD45RA+, CD62L+. En otros ejemplos más, la célula linfocito T citotóxico CD8+ se selecciona del grupo que consiste en linfocitos T CD8+ indiferenciados, linfocitos T CD8+ de memoria central, linfocitos T CD8+ de memoria efectora o linfocitos T CD8+ en masa. En una realización específica, la célula linfocito T citotóxico CD8+ es un linfocito T de memoria central en donde el linfocito T de memoria central comprende un linfocito T CD8+ CD45RO+, CD62L+. En una realización específica, la célula linfocito T citotóxico CD8+ es un linfocito T de memoria central y la célula linfocito T CD4+ auxiliar es un linfocito T CD4+ indiferenciado.

En realizaciones, el linfocito T CD8+ y el linfocito T CD4+ están ambos genéticamente modificados con un CAR que

comprende un dominio de cadena pesada de anticuerpo que se une específicamente a un patógeno o antígeno de superficie celular específico de tumor. En otras realizaciones, el dominio de señalización intracelular de los linfocitos T citotóxicos CD8 es el mismo que el dominio de señalización intracelular de los linfocitos T CD4 auxiliares. En otras realizaciones más, el dominio de señalización intracelular de los linfocitos T citotóxicos CD8 es diferente al dominio de señalización intracelular de los linfocitos T CD4 auxiliares.

Los sujetos que se pueden tratar mediante la presente invención son, en general, sujetos humanos y otros primates, tales como monos y macacos con fines de medicina veterinaria. Los sujetos pueden ser hombre o mujer y pueden tener cualquier edad adecuada, incluyendo bebés, juveniles, adolescentes, adultos y sujetos geriátricos.

Los métodos son útiles en el tratamiento de, por ejemplo, tumor sólido, neoplasias hematológicas, melanoma o infección con un virus u otro patógeno. Infecciones con patógenos, incluyen VIH, VHC, VHB, CMV y enfermedad parasitaria. En algunas realizaciones, el antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno se selecciona del grupo que consiste en el receptor huérfano de tirosina cinasa ROR1, tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, mesotelina, CEA y antígeno de superficie de la hepatitis B.

Los sujetos que se pueden tratar incluyen sujetos afectados por cáncer, incluyendo, pero sin limitación, cáncer de colon, pulmón, hígado, mama, próstata, ovario, piel (incluyendo el melanoma), hueso y cerebro, etc. En algunas realizaciones se conocen los antígenos asociados a tumores, tales como melanoma, cáncer de mama, carcinoma escamocelular, cáncer de colon, leucemia, mieloma, cáncer de próstata, etc. (en estas realizaciones, los linfocitos T de memoria se pueden aislar o genomanipular mediante la introducción de genes del receptor de linfocitos T). En otras realizaciones, las proteínas asociadas a tumores pueden dirigirse con linfocitos T modificados genéticamente que expresan un inmunorreceptor genomanipulado. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, linfoma de linfocitos B, cáncer de mama, cáncer de próstata y leucemia.

Los sujetos que se pueden tratar también incluyen sujetos que padecen, o están en riesgo de desarrollar, una enfermedad infecciosa, incluyendo, pero sin limitación, infecciones víricas, retrovíricas, bacterianas y protozoarias, etc. Los sujetos que se pueden tratar incluyen pacientes inmunodeficientes afectados por una infección vírica, incluyendo, pero sin limitación, citomegalovirus (CMV), virus Epstein Barr (EBV), adenovirus, infecciones por poliomavirus BK en pacientes trasplantados, etc.

Las células preparadas como se describe anteriormente se pueden utilizar en métodos y composiciones para inmunoterapia adoptiva de acuerdo con técnicas conocidas, o variaciones de las mismas que serán evidentes para los expertos en la materia basándose en la presente divulgación. Véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2003/0170238 de Gruenberg et al; ver *además* la patente de Estados Unidos N.º 4.690.915 de Rosenberg.

En algunos ejemplos, las células se formulan en primer lugar mediante su recolección de su medio de cultivo y luego lavando y concentrando las células en un medio y un sistema de recipientes adecuados para la administración (un vehículo "farmacéuticamente aceptable") en una cantidad eficaz para el tratamiento. El medio de infusión adecuado puede ser cualquier formulación de medio isotónico, solución salina por lo general normal, Normosol R (Abbott) o Plasma-Lyte A (Baxter), pero también se puede utilizar dextrosa al 5 % en agua o lactato de Ringer. El medio de infusión se puede complementar con albúmina de suero humano.

Una cantidad de células eficaz para tratamiento en la composición es de al menos 2 células (por ejemplo, 1 linfocito T CD8+ de memoria central y 1 subconjunto de linfocitos T CD4+ auxiliares) o es más normalmente mayor que 10^2 células, y hasta 10^6 , hasta 10^8 o 10^9 células inclusive y puede ser más de 10^{10} células. El número de células dependerá del uso final para el que esté destinada la composición, así como del tipo de células incluidas en la misma. Por ejemplo, si se desean células que sean específicas para un antígeno particular, entonces la población contendrá más de un 70 %, generalmente más de un 80 %, 85 % y 90-95 % de dichas células. Para los usos proporcionados en el presente documento, las celdas generalmente tienen un volumen de un litro o menos, puede ser de 500 ml o menos, incluso 250 ml o 100 ml o menos. Por tanto, la densidad de las células deseadas suele ser mayor de 10^6 células/ml y generalmente es mayor de 10^7 células/ml, generalmente 10^8 células/ml o más. El número clínicamente relevante de células inmunitarias se puede distribuir en múltiples infusiones que acumulan igual o superan los 10^9 , 10^{10} o 10^{11} células.

En algunas realizaciones, los linfocitos de la invención se pueden usar para conferir inmunidad a los individuos. Por "inmunidad" se entiende una disminución de uno o más síntomas físicos asociados a una respuesta a la infección por un patógeno o un tumor, al que se dirige la respuesta de los linfocitos. La cantidad de células administradas suele estar en el intervalo presente en individuos normales con inmunidad al patógeno. Por lo tanto, las células generalmente se administran mediante infusión, con cada infusión en un intervalo de 2 células, hasta al menos 10^6 a 10^{10} células/m², preferentemente en el intervalo de al menos 10^7 a 10^9 células/m². Los clones pueden administrarse mediante una única infusión o mediante múltiples infusiones durante un intervalo de tiempo. Sin embargo, dado que se espera que diferentes individuos varíen en capacidad de respuesta, el tipo y la cantidad de células infundidas, así como el número de infusiones y el intervalo de tiempo durante el cual se administran múltiples infusiones, se determinan por el médico tratante, y se pueden determinar mediante un examen de rutina. La generación de niveles suficientes de linfocitos T

(incluyendo linfocitos T citotóxicos y/o linfocitos T auxiliares) se puede lograr fácilmente usando el método de expansión rápida de la presente invención, como se ejemplifica en el presente documento. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 6.040.177 de Riddell *et al.* en la columna 17.

- 5 La presente invención se ilustra adicionalmente en los ejemplos que se exponen a continuación.

PARTE EXPERIMENTAL

Ejemplo 1 - Transducción de linfocitos T y análisis de expresión de CAR

- 10 Un CAR específico para ROR1 se puede expresar en linfocitos T CD8+ humanos y confiere un reconocimiento específico de tumores de linfocitos B ROR1+ y no de linfocitos B normales maduros. Se construyó un receptor quimérico para antígeno específico para ROR1 que cuando se expresa en linfocitos T de donantes sanos o pacientes con CLL confería un reconocimiento específico de B-CLL primaria y linfoma de células del manto.

15 Materiales y métodos

Líneas celulares

- 20 Se generaron linfocitos B transformados con virus de Epstein-Barr (EBV-LCL) como se describe (25). Se proporcionaron líneas celulares tumorales Jeko-1 y BALL-1 por los Drs. Oliver Press y Jerald Radich (Fred Hutchinson Cancer Research Center). Todas las líneas celulares se mantuvieron en RPMI, suero de ternera fetal al 10 %, L-glutamina 0,8 mM y penicilina-estreptomicina al 1 % (medio LCL). Se obtuvieron células K562 de la American Type Culture Collection.

25 Transfección de células K562 con *ROR1*

- Para amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) del *gen ROR1*, se obtuvo ARN total de linfocitos B-CLL (RNeasyPlusKit; QIAGEN) y se transcribió de forma inversa en ADNc con M-MLVReverse Transcriptasa (Invitrogen). La PCR se realizó con cebadores específicos

(*ROR1-F*: 5-*Xho*IAGAGGAGGAATGCACCGGCC-3 y
ROR1-R: 5-*Xho*I-CACAGAAGGTACTTGTTCGATGT-3)

- 35 usando ADN polimerasa Herculase-II (Stratagene). El producto de PCR se clonó en el vector retroviral MIGR-1 (23) y se verificó la secuencia. El reactivo de transfección Effectene (QIAGEN) se utilizó para transfectar células Platinum-A (Cell Biolabs) con MIGR-1/*ROR1* y producir retrovirus que codifica *ROR1*. Las células K562 se transdujeron de forma retroviral mediante centrifugación a 2500 rpm durante 60 minutos a 32 °C, se expandieron y el subconjunto positivo para ROR1 se purificó por clasificación.

40 PCR cuantitativa en tiempo real

- Se preparó ADNc de primera hebra de B-CLL, células B activadas y en reposo normales, y EBV-LCL como se describe en el párrafo anterior. El ADNc de primera hebra de tejidos normales (paneles de tejido humano I/II, Blood Fractions) se obtuvo de Clontech. Se analizó la expresión de ARNm de *ROR1* por duplicado y se normalizó a *GAPDH*. Se realizaron amplificaciones en un ABI Prism 7900 (Applied Biosystems) en una reacción de 50 µl que consistió de 25 µl de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2,5 ng de ADNc y cebadores directos e inversos específicos de gen 300 nM:

- 50 *ROR1-F* 5-AGCGTGCGATTCAAAGGATT-3,
ROR1-R 5-GACTGGTGCCGACGATGACT-3,
GAPDH-F 5-GAAGGTGAAGTCGGAGTC-3,
y *GAPDH-R* 5-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3.

- 55 El umbral del ciclo (Ct, por sus siglas en inglés) se determinó usando el programa informático SDS v2.2.2 (Applied Biosystems) y el nivel de expresión génica se calculó usando el método comparativo Ct (2- (ΔΔCt)).

Construcción vectorial y generación de lentivirus

- 60 Los vectores lentivirales que codifican CD20-CAR (CD20R-epHIV7) y proteína verde fluorescente (GFP) (GFP-epHIV7) se describieron previamente (24). El ROR1-CAR se codificó en el mismo vector. Se generó un AcM de ratón (clon 2A2) que demostró unión específica a ROR1 humano expresado en líneas tumorales B-CLL y MCL primarias, se clonó y se caracterizó en un estudio previo. Una secuencia de nucleótidos de codón optimizado que codifica un scFv que contiene la cadena VL y VH del AcM 2A2 se sintetizó (GENEART) y se clonó en CD20R-epHIV7 usando sitios de restricción NheI y RsrII para reemplazar el scFv específico de CD20. El lentivirus se produjo en células 293T transfectadas conjuntamente con el vector lentiviral y los vectores de empaquetamiento pCHGP-2, pCMVRev2 y

pCMV-G utilizando Effectene (Qiagen). El medio se cambió 16 horas después de la transfección y el lentivirus se recogió después de 48 horas.

Transducción lentivírica y aislamiento de clones de linfocitos T transducidos con CAR

PBMC de donantes sanos y pacientes con LLC-B, y linfocitos T de memoria central (TCM) CD8+CD45RO+CD62L+ purificados por clasificación se activaron con AcM anti-CD3 (30 ng/ml) (25) y se transdujeron en sobrenadante lentivírico complementado con 1 µg/ml de polibreno (Sigma-Aldrich) y 50 UI/ml de interleucina 2 (IL-2) humana recombinante los días 2 y 3 después de la activación mediante centrifugación a 2500 rpm durante 60 minutos a 32 °C. Los linfocitos T se expandieron en RPMI que contenía suero humano al 10 %, L-glutamina 2 mM y estreptomicina penicilina al 1 % (medio CTL) (25). Después de la expansión, una alícuota de cada línea de linfocitos T transducidos se tiñó con AcM anti-EGFR (receptor del factor de crecimiento epitelial) conjugado con biotina, estreptavidina-PE y AcM anti-CD8. Los linfocitos T CD8+EGFR+ se purificaron por clasificación y se clonaron mediante dilución limitante (0,5 células/pocillo) (25). Se identificaron linfocitos T transducidos con ROR1-CAR mediante tinción con proteína de fusión de dominio extracelular Fc-ROR1 recombinante biotinilada y estreptavidina-PE. La proteína ROR1 recombinante se produjo en células 293F transfectadas transitoriamente (Invitrogen), se purificó como se describe (26), y se biotiniló usando el kit BiotinTag (Sigma). Los linfocitos T CD8+ transducidos con GFP se identificaron mediante citometría de flujo, se purificaron por clasificación y se clonaron de manera similar.

Ensayos de liberación de cromo y secreción de citocinas

Las células diana se marcaron con ⁵¹Cr (PerkinElmer) durante la noche, se lavaron e incubaron por triplicado a 1-2 x 10³ células/pocillo con linfocitos T efectores en diversas proporciones efector a diana (E:D). Los sobrenadantes se recogieron para el recuento y después de una incubación de 4 horas y se calculó la lisis específica usando la fórmula estándar (25).

Resultados

Los linfocitos T CD8+ transducidos se purificaron por clasificación usando un AcM anti-EGFR biotinilado y colorantes conjugados con estreptavidina. La expresión de ROR1-CAR en la superficie de los linfocitos T purificados por clasificación se evaluó mediante tinción de las células con una proteína de fusión de dominio extracelular Fc-ROR1 recombinante biotinilada que se une directamente al scFv de ROR1-CAR y la combinación con conjugados de estreptavidina. La proteína Fc-ROR1 tiñó específicamente linfocitos T CD8+ transducidos con el vector lentivírico ROR1-CAR pero no linfocitos T CD8+ transducidos con un vector lentivírico de control que codifica GFP (Figura 1).

Se establecieron clones de linfocitos T CD8+ transducidos con ROR1-CAR (n = 10) y transducidos con GFP de control (n = 4) limitando la dilución y se confirmó la expresión de superficie estable del CAR después de múltiples rondas de expansión *in vitro*. No hubo diferencia aparente en el crecimiento de clones de linfocitos T transducidos con ROR1-CAR en comparación con los no transducidos o los transducidos con GFP (datos no mostrados).

Los clones de linfocitos T transducidos con ROR1-CAR lisaron eficazmente células B-CLL y K562 primarias que se transfectaron de manera estable con el *gen ROR1*, pero no células K562 negativas para ROR1 naturales, demostrando un reconocimiento específico de ROR1 (Figura 2).

Discusión

Las inmunoterapias adoptivas que emplean linfocitos T modificados con CAR se están investigando en ensayos clínicos para neoplasias malignas de linfocitos B. Las moléculas de superficie a las que se dirige son específicas del linaje de linfocitos B e incluyen CD19, que se expresa en células de linaje B normales desde la etapa pro-linfocitos B hasta células plasmáticas, y CD20, que se expresa en los linfocitos B normales desde la etapa pre-linfocitos B hasta los linfocitos B de memoria. Por lo tanto, un resultado anticipado de la terapia eficaz dirigida a estas moléculas es el agotamiento de los linfocitos B normales y de los precursores de los linfocitos B. Los estudios de perfiles de expresión génica han identificado genes que se expresan preferentemente o exclusivamente mediante linfocitos B malignos pero no normales y *ROR1* surgió como un gen característico de la CLL en 2 análisis independientes (27,28). Se desarrollaron anticuerpos específicos para ROR1 en pacientes con CLL después de la vacunación con células tumorales autólogas que habían sido modificadas para expresar CD154 y tratamientos con lenalidomida sin toxicidad aparente para los tejidos normales, lo que sugiere que este antígeno tumoral puede ser una diana adecuada para la inmunoterapia (29,30).

Los presentes estudios ilustran la posibilidad de dirigir células malignas positivas para ROR1 con linfocitos T genomanipulados que expresan un ROR1-CAR. Los linfocitos T CD8+ ROR1-CAR podrían proceder tanto de donantes normales como de pacientes con CLL después de la transducción lentivírica de PBMC en masa o de TCM purificados por clasificación, que en modelos animales persisten durante períodos prolongados después de una transferencia adoptiva (31). Los linfocitos T transducidos con ROR1-CAR lisaron eficazmente la B-CLL primaria, pero no linfocitos B normales en reposo o activados. Estos linfocitos T produjeron citocinas efectoras incluyendo TNF-α, IFNγ e IL-2, y fueron capaces de proliferar en respuesta a células tumorales que expresan ROR1.

Ejemplo 2 - Generación de líneas de linfocitos T CD4+ CAR y análisis de la función efectora

Los linfocitos T CD4+ ROR1-CAR se pueden generar a partir de PBMC de donantes sanos/pacientes con CLL. Un CAR específico para ROR1 se puede expresar en linfocitos T CD4+ humanos y confiere un reconocimiento específico de tumores de linfocitos B ROR1+ pero no de linfocitos B normales maduros.

Materiales y métodos

Líneas celulares

Se generaron linfocitos B transformados con virus de Epstein-Barr (EBV-LCL) como se describe (25). Se proporcionaron líneas celulares tumorales Jeko-1 y BALL-1 por los Drs. Oliver Press y Jerald Radich (Fred Hutchinson Cancer Research Center). Todas las líneas celulares se mantuvieron en RPMI, suero de ternera fetal al 10 %, L-glutamina 0,8 mM y penicilina-estreptomicina al 1 % (medio LCL). Se obtuvieron células K562 y 293T de la American Type Culture Collection y se cultivaron como se indica.

Transfección de células K562 con ROR1

Para amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) del *gen ROR1*, se obtuvo ARN total de linfocitos B-CLL (RNeasyPlusKit; QIAGEN) y se transcribió de forma inversa en ADNc con M-MLV Reverse Transcriptasa (Invitrogen). La PCR se realizó con cebadores específicos

(ROR1-F: 5'-XhoIAGAGGAGGAATGCACCGGCC-3' y

ROR1-R: 5'-XhoI-CACAGAAGGTACTTGTGCGATGT-3')

usando ADN polimerasa Herculanase-II (Stratagene). El producto de PCR se clonó en el vector retroviral MIGR-1 (23) y se verificó la secuencia. El reactivo de transfección Effectene (QIAGEN) se utilizó para transfectar células Platinum-A (Cell Biolabs) con MIGR-1/ROR1 y producir retrovirus que codifica ROR1. Las células K562 se transdujeron de forma retroviral mediante centrifugación a 2500 rpm durante 60 minutos a 32 °C, se expandieron y el subconjunto positivo para ROR1 se purificó por clasificación.

Construcción vectorial y generación de lentivirus

Los vectores lentivirales que codifican CD20-CAR (CD20R-epHIV7) y proteína verde fluorescente (GFP) (GFP-epHIV7) se describieron previamente (24). El ROR1-CAR se codificó en el mismo vector. Se generó un AcM de ratón (clon 2A2) que demostró unión específica a ROR1 humano expresado en líneas tumorales B-CLL y MCL primarias, se clonó y se caracterizó en un estudio previo. Una secuencia de nucleótidos de codón optimizado que codifica un scFv que contiene la cadena VL y VH del AcM 2A2 se sintetizó (GENEART) y se clonó en CD20R-epHIV7 usando sitios de restricción NheI y RsrII para reemplazar el scFv específico de CD20. El lentivirus se produjo en células 293T transfectadas conjuntamente con el vector lentiviral y los vectores de empaquetamiento pCHGP-2, pCMVRev2 y pCMV-G utilizando Effectene (Qiagen). El medio se cambió 16 horas después de la transfección y el lentivirus se recogió después de 48 horas.

Transducción lentiviral y aislamiento de líneas de linfocitos T CD4+ ROR1-CAR

Se aislaron linfocitos T CD4+ de PBMC de donantes sanos y se activaron con AcM anti-CD3 (30 ng/ml) (25), y se transdujeron en sobrenadante lentiviral complementado con 1 µg/ml de polibreno (Sigma-Aldrich) y 50 UI/ml de interleucina 2 (IL-2) humana recombinante los días 2 y 3 después de la activación mediante centrifugación a 2500 rpm durante 60 minutos a 32 °C. Los linfocitos T se expandieron en RPMI que contenía suero humano al 10 %, L-glutamina 2 mM y estreptomicina penicilina al 1 % (medio CTL). (25) Después de la expansión, una alícuota de cada línea de linfocitos T transducidos se tiñó con AcM anti-EGFR (receptor del factor de crecimiento epitelial) conjugado con biotina, estreptavidina-PE y AcM anti-CD4. Los linfocitos T CD4+ EGFR+ se purificaron por clasificación y se expandieron. Se identificaron linfocitos T transducidos con ROR1-CAR mediante tinción con proteína de fusión de dominio extracelular Fc-ROR1 recombinante biotinilada y estreptavidina-PE. La proteína ROR1 recombinante se produjo en células 293 transfectadas transitoriamente (Invitrogen), se purificó como se describe (26), y se biotiniló usando el kit BiotinTag (Sigma). Los linfocitos T CD4+ transducidos con GFP se identificaron mediante citometría de flujo, se purificaron por clasificación y se clonaron de manera similar.

Ensayos de liberación de cromo y secreción de citocinas

Las células diana se marcaron con ⁵¹Cr (PerkinElmer) durante la noche, se lavaron e incubaron por triplicado a 1-2 x 10³ células/pocillo con linfocitos T efectoras en diversas proporciones efector a diana (E:D). Los sobrenadantes se recogieron para el recuento y después de una incubación de 4 horas y se calculó la lisis específica usando la fórmula estándar (25). Para el análisis de secreción de citocinas, las células diana y efectoras se sembraron en pocillos por triplicado en una proporción E/D de 2:1, y el interferón INFγ, el factor de necrosis tumoral (TNF-α) y la IL-2 se midieron mediante inmunoensayo de citocinas múltiple (Luminex) en el sobrenadante extraído después de una incubación de

24 horas.

Ensayo de proliferación de CFSE

- 5 Se marcaron linfocitos T con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE; Invitrogen) 0,2 μ M, se lavaron y se colocaron en placas con células estimuladoras en una proporción de 2:1 en medio CTL que contenía 10 U/ml de IL-2 humana recombinante. Después de una incubación de 72 horas, las células se marcaron con AcM anti-CD4 y yoduro de propidio (PI) para excluir las células muertas del análisis. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo y se evaluó la división celular de linfocitos T CD4⁺ vivos mediante dilución de CFSE.

Ensayo de cultivo conjunto

Se marcaron linfocitos T CD4⁺ transducidos con ROR1-CAR y linfocitos T citotóxicos CD8⁺ transducidos con ROR1-CAR con CFSE y se cultivaron conjuntamente en una proporción de 2:1, 1:1 y 1:2. A continuación, los cultivos conjuntos se estimularon con células K562/ROR1 y células K562 de control y se midió la proliferación celular mediante un ensayo de dilución de tinte CFSE después de 5 días de incubación. Para análisis de flujo, las muestras se tiñeron con AcM anti-CD8 y anti-CD4 conjugados para distinguir los subconjuntos CD8⁺ y CD4⁺.

Resultados

Generación de linfocitos T CD4⁺ ROR1-CAR a partir de PBMC de donantes sanos y pacientes con CLL

Se demostró que ROR1, un receptor de tirosina cinasa oncofetal, se expresa uniformemente en CLL y MCL, y se desarrolló un ROR1-CAR a partir de un AcM anti-ROR1 que confiere reconocimiento específico de linfocitos B malignos, pero no de linfocitos B normales maduros cuando se expresan en linfocitos T CD8⁺ (32). En este caso, se generaron linfocitos T CD4⁺ ROR1-CAR para analizar el reconocimiento directo de tumores y su capacidad para aumentar los CTL CD8⁺ ROR1-CAR. Los linfocitos T CD4⁺ modificados con CAR podrían generarse fácilmente a partir de linfocitos T CD4⁺ periféricos en masa de donantes sanos (n = 4) y pacientes con CLL (n = 4) utilizando un vector lentivírico que codifica ROR1-CAR. En este vector, se codificó un dominio EGFR truncado (receptor del factor de crecimiento epitelial, tEGFR) cadena abajo del ROR1-CAR y un elemento 2A autoescindible, para servir tanto como marcador de transducción como para el enriquecimiento de linfocitos T que expresan transgén con AcM anti-EGFR (Figura 3). Se determinó la frecuencia de linfocitos T modificados con CAR en d12 después de una sola transducción con lentivirus que codifica ROR1-CAR (MOI = 3) utilizando el marcador tEGFR y se encontraron eficacias de transducción consistentemente más altas en líneas de linfocitos T CD4⁺ en comparación con CD8⁺ CAR obtenidas de los mismos individuos. Para confirmar la expresión del ROR1-CAR en la superficie de linfocitos T CD4⁺, se utilizó la proteína de fusión del dominio extracelular Fc-ROR1 recombinante biotinilada que se une directamente al scFv del ROR1-CAR y tiñe específicamente linfocitos T CD4⁺ transducidos con lentivirus ROR1-CAR pero no linfocitos T CD4⁺ no transducidos de control (Figura 3). Se enriquecieron los linfocitos T CD4⁺ que expresan transgen utilizando el marcador tEGFR y se expandió el subconjunto de linfocitos T positivos para CAR mediante estimulación con AcM anti-CD3. Se podría lograr una expansión de más de 3 log de linfocitos T CD4⁺ CAR al final de un ciclo de estimulación de 14 días, que es equivalente a la amplificación observada en CTL CD8⁺ CAR. Después de la expansión, se confirmó la expresión estable del ROR1-CAR en la superficie celular de linfocitos T CD4⁺ CAR (datos no mostrados) y se analizó el reconocimiento de células tumorales positivas para ROR1.

Los linfocitos T CD4⁺ ROR1-CAR reconocen específicamente tumores positivos para ROR1

Se analizó la función efectora de linfocitos T CD4⁺ ROR1-CAR contra células tumorales primarias positivas para ROR1 y líneas de células tumorales. Se analizó la capacidad de los linfocitos T CD4⁺ CAR para conferir citotoxicidad directa mediante ensayo de liberación de cromo (CRA, por sus siglas en inglés) y se detectó lisis débil pero específica de células diana positivas para ROR1 al final de la incubación estándar de 4 horas (Figura 4). Se extendió el CRA a 10 horas y se observó un aumento adicional en la lisis específica, sin embargo, la actividad citolítica general de los linfocitos T CD4⁺ CAR aún era más bajas que la de los CTL CD8⁺ ROR1-CAR (Figura 2, 4). Los linfocitos T CD4⁺ ROR1-CAR de donantes sanos y pacientes con CLL reconocieron específicamente las células CLL primarias, las líneas celulares tumorales positivas para ROR1 Jeko-1 (MCL) y BALL-1 (B-ALL), y las células K562 que se transfectaron de manera estable con el gen ROR1 (K562/ROR1) pero no las células K562 naturales negativas para ROR1 mediante ELISA de IFN- γ , lo que demuestra un reconocimiento específico de ROR1 en la superficie celular de células diana (Figura 5A). El análisis de citocinas múltiple reveló una producción de otras citocinas Th1 tales como TNF- α e IL-2 en niveles significativamente más altos en comparación con CTL CD8⁺ CAR, y la producción de IL-4, IL-10 e IL-17 (Figura 5B).

A continuación, se evaluó la proliferación de linfocitos T CD4⁺ CAR después de la estimulación con células tumorales positivas para ROR1 mediante tinción con CFSE y se utilizaron condiciones de cultivo rigurosas sin adición de citocinas exógenas para eliminar cualquier posible estímulo inespecífico. Los linfocitos T CD4⁺ CAR mostraron una proliferación considerable y específica en respuesta a células tumorales positivas para ROR1. Tanto el porcentaje de linfocitos T que se indujo a proliferar como el número de divisiones celulares que realizó el subconjunto proliferante fue significativamente mayor en linfocitos T CD4⁺ en comparación con linfocitos T CD8⁺ CAR (Figura 6). En conjunto, los

presentes datos demuestran que los linfocitos T CD4⁺ obtenidos tanto de donantes sanos como de pacientes con CLL adquieren reactividad antitumoral después de la modificación genética con un CAR específico para ROR1. Asimismo, la capacidad de proliferar en ausencia de citocinas exógenas y de producir altos niveles de citocinas Th1 sugiere que los linfocitos T CD4⁺ CAR ejercen funciones auxiliares normales después de la estimulación a través del CAR y, además de conferir efectos antitumorales directos, también podría utilizarse para aumentar los CTL CD8⁺ CAR.

Los linfocitos T CD4⁺ modificados con CAR, pero no transducidos, ayudan a los CTL CD8⁺ CAR

Para analizar si los linfocitos T CD4⁺ CAR son capaces de ayudar a los CTL CD8⁺ CAR, se realizaron experimentos de cultivo conjunto con líneas de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ policlonales transducidos con CAR y no transducidos de control que se establecieron a partir de donantes sanos y pacientes con CLL. Como lectura para la prestación de ayuda, se define una mejora en la función efectora de CD8⁺ específico de tumor en presencia de linfocitos T CD4⁺ en comparación con linfocitos T CD8⁺ cultivados solos. Se combinaron linfocitos T CD4⁺ transducidos con CAR o no transducidos de control con CTL CD8⁺ CAR en distintas proporciones de CD4:CD8 (2:1, 1:1, 1:2), se estimularon con células tumorales positivas para ROR1 y se midió la proliferación mediante dilución de tinte CFSE. Se encontró, que la adición de linfocitos T CD4⁺ transducidos con CAR, pero no los no transducidos, a CTL CD8⁺ CAR aumentó significativamente la proliferación específica del subconjunto CD8⁺ en comparación con CTL CD8⁺ CAR solo (Figura 7). El aumento de la proliferación fue más pronunciado, cuando se añadió al menos una cantidad equivalente de linfocitos T CD4⁺ CAR (proporción CD4:CD8 de 2:1 o 1:1) al cultivo conjunto. La combinación de linfocitos T CD4⁺ no transducidos con linfocitos T CD8⁺ no transducidos sirvió como control adicional y no indujeron una proliferación inespecífica en el subconjunto CD8⁺ (datos no mostrados).

Discusión

Los estudios de perfiles de expresión génica han identificado genes que se expresan preferentemente o exclusivamente mediante linfocitos B malignos pero no normales y *ROR1* surgió como un gen característico de la CLL en 2 análisis independientes (27,28). Los presentes estudios ilustran la posibilidad de dirigir células malignas positivas para ROR1 con linfocitos T genomanipulados que expresan un ROR1-CAR. Los linfocitos T CD8 y CD4⁺ ROR1-CAR podrían proceder de donantes normales después de la transducción lentivírica de PBMC en masa o linfocitos T purificados por clasificación. Los linfocitos T CD8⁺ transducidos con ROR1-CAR lisaron de manera eficaz B-CLL primaria, pero no linfocitos B normales en reposo o activados. Los linfocitos T CD4⁺ transducidos con ROR1-CAR lisaron débilmente B-CLL primaria, pero no linfocitos B normales en reposo o activados. Estos linfocitos T produjeron citocinas efectoras incluyendo TNF- α , IFN γ , IL-2, IL-4 y IL-10. Los linfocitos T CD4⁺ transducidos con CAR produjeron cantidades significativamente mayores de citocinas que los linfocitos CD8⁺ transducidos. Ambos tipos de células fueron capaces de proliferar en respuesta a las células tumorales que expresan ROR1. De nuevo, los linfocitos T CD4⁺ ROR1-CAR proliferaron 2-3 veces más que los CTL CD8⁺ ROR1-CAR. Estos resultados indican que los linfocitos T CD4⁺ auxiliares transducidos ejercen funciones auxiliares normales, lo que sugiere que podrían utilizarse para aumentar los CTL CD8⁺ CAR.

Ejemplo 3 - La función efectora de linfocitos T CD4⁺ ROR1-CAR a partir de subconjuntos indiferenciados, de memoria central y efectora

Se comparó la función efectora de los linfocitos T CD4 procedentes de subconjuntos indiferenciados, de memoria central y efectora y luego se modificaron con el ROR1 CAR.

Materiales y métodos

Purificación por clasificación de linfocitos CD4 indiferenciados, de memoria central y efectora

Se aislaron linfocitos T CD4⁺ de PBMC de un donante sano usando selección de perlas magnéticas negativas (kit de aislamiento Miltenyi CD4) que produce linfocitos T CD4⁺ inalterados. La fracción CD4⁺ se marcó con AcM anti-CD45RA, anti-CD45RO y anti-CD62L conjugados y se purificó por clasificación de flujo usando un clasificador de flujo FACS Aria (BD Biosciences) y los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados (CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD62L⁺), de memoria central (CD45RA⁻ CD45RO⁺ CD62L⁺) y memoria efectora (CD45RA⁻ CD45RO⁺ CD62L⁻) se purificaron basándose en la expresión de estos marcadores definidos.

Ensayo de proliferación de CFSE

Se marcaron linfocitos T con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE; Invitrogen) 0,2 μ M, se lavaron y se colocaron en placas con células estimuladoras en una proporción de 2:1 en medio CTL que contenía 10 U/ml de IL-2 humana recombinante. Después de una incubación de 72 horas, las células se marcaron con AcM anti-CD8 o CD4 y yoduro de propidio (PI) para excluir las células muertas del análisis. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo y se evaluó la división celular de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ vivos mediante dilución de CFSE.

Ensayos de citocinas

Para análisis de secreción de citocinas, las células diana y efectoras se sembraron en pocillos por triplicado en una proporción E/D de 2:1, y el interferón INF γ , el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la IL-2 se midieron mediante inmunoensayo de citocinas múltiple (Luminex) en el sobrenadante extraído después de una incubación de 24 horas.

5 Resultados

Se purificaron por clasificación de flujo linfocitos T CD4⁺ I, CD4⁺ de memoria central (MC) y efectora (ME) de la sangre periférica de 3 donantes sanos según la expresión de CD45RA, CD45RO y CD62L (Figura 8A), y se comparó su función efectora después de la modificación con el ROR1-CAR. Se lograron eficacias de transducción igualmente altas en líneas de linfocitos T CAR procedentes de cada uno de los tres subconjuntos. La citometría de flujo multiparamétrica después del enriquecimiento de linfocitos T que expresan transgén mostró expresión de CD45RO y pérdida de CD45RA en la línea de linfocitos T CD4⁺ I CAR, coherente con un fenotipo activado después de la transducción lentivírica. Las líneas de linfocitos T CD4⁺ I, MC y ME CAR retuvieron la expresión diferencial de CD62L, lo que confirma que la purificación por clasificación de flujo inicial se había realizado con alta pureza.

A continuación, se analizó el reconocimiento de tumores, la secreción de citocinas y la proliferación de linfocitos T CD4⁺ CAR procedentes de subconjuntos I, de MC y de ME y se compararon con las líneas de linfocitos T CAR generadas a partir de linfocitos T CD4⁺ en masa. Se observó el reconocimiento específico de células tumorales positivas para ROR1 mediante ELISA de IFN- γ en cada una de las líneas celulares. El análisis de citocinas múltiple reveló que los linfocitos T CD4⁺ CAR procedentes del subconjunto I producían, con mucho, los niveles más altos de citocinas Th1, especialmente IL-2 (Figura 8C) y la dilución de tinte CFSE mostró que proliferaban más vigorosamente en respuesta a la estimulación con células tumorales positivas para ROR1 (Figura 8B).

Discusión

Los presentes estudios ilustran la posibilidad de dirigir células malignas positivas para ROR1 con linfocitos T genomanipulados que expresan un ROR1-CAR. Los linfocitos T CD8 y CD4⁺ ROR1-CAR podrían proceder de donantes normales después de la transducción lentivírica de PBMC en masa y linfocitos T purificados por clasificación a partir de subconjuntos definidos de linfocitos T indiferenciados o de memoria. Los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados, de memoria central, y efectora produjeron citocinas efectoras incluyendo TNF α , IFN γ , IL-2, IL-4 y IL-10. Los linfocitos CD4⁺ transducidos con CAR procedentes del subconjunto indiferenciado produjeron cantidades significativamente mayores de TNF α e IL-2 que los linfocitos T CD4⁺ CAR procedentes de memoria central y efectora después de la señalización a través del CAR. Todos los tipos de linfocitos CD4 fueron capaces de proliferar en respuesta a ROR1/K562, sin embargo, en los linfocitos CD4⁺ transducidos con CAR procedentes del subconjunto indiferenciado, el porcentaje de linfocitos T que se indujo a proliferar y el número de divisiones celulares que experimentó el subconjunto en proliferación fue significativamente mayor. Tanto el perfil de citocinas como la capacidad proliferativa indican que los linfocitos T CD4⁺ ROR1-CAR indiferenciados pueden ser los más adecuados para aumentar los CTL CD8⁺ ROR1-CAR.

Ejemplo 4 - Los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados son mejores auxiliares que los linfocitos T CD4⁺ de memoria

Se cultivaron conjuntamente linfocitos T CD4⁺ indiferenciados, de memoria central y efectora transducidos con linfocitos T citotóxicos CD8⁺ transducidos y se midió la respuesta proliferativa de las células en respuesta a la estimulación con células K562/ROR1.

Materiales y métodos

Cultivo conjunto

Se marcaron linfocitos T CD4⁺ transducidos con ROR1-CAR procedentes de indiferenciados, de memoria central y efectora y linfocitos T citotóxicos CD8⁺ transducidos con ROR1-CAR procedentes de linfocitos T CD8⁺ indiferenciados y de memoria central con CFSE, y las líneas de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ CAR se cultivaron conjuntamente en una proporción de 1:1. A continuación, los cultivos conjuntos se estimularon con células K562/ROR1 y células K562 de control y se midió la proliferación celular mediante un ensayo de dilución de tinte CFSE después de 5 días de incubación. Para análisis de flujo, las muestras se tificaron con AcM anti-CD8 y anti-CD4 conjugados para distinguir los subconjuntos CD8⁺ y CD4⁺.

Resultados

Los linfocitos T CD4⁺ CAR indiferenciados tienen una capacidad superior para aumentar la función efectora de los CTL CD8⁺ CAR

Se comparó la función auxiliar de líneas de linfocitos T CD4⁺ CAR I, de MC y EM para determinar si el perfil de citocinas favorable y el potencial proliferativo de los linfocitos T CD4⁺ CAR I también se traducirían en el efecto auxiliar más fuerte para CTL CD8⁺ CAR. Trabajos anteriores han demostrado que existen diferencias intrínsecas entre linfocitos T CD8⁺ I, de MC y de ME que afectan su posible utilidad para la inmunoterapia adoptiva. El presente grupo ha

demostrado recientemente que los linfocitos T CD8⁺ procedentes de MC pero no de ME son capaces de persistir durante períodos prolongados después de la transferencia adoptiva, lo que los convierte en un subconjunto preferido de linfocitos T CD8⁺ para inmunoterapia (33,34). Otros grupos sugirieron que los linfocitos T CD8⁺ I también pueden poseer rasgos favorables para usar en terapia con linfocitos T (35,36). Por lo tanto, se generaron CTL CD8⁺ CAR a partir de linfocitos T I y de MC purificados por clasificación para determinar la combinación óptima de subconjuntos de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ CAR. Después de la transducción lentivírica y el enriquecimiento de linfocitos T CD8⁺ transducidos con CAR que utilizan el marcador tEGFR, se confirmó la reactividad tumoral de CTL CD8⁺ I, y de MC CAR (datos no mostrados) y se realizaron experimentos de cultivos conjuntos con linfocitos T CD4⁺ CAR como antes. Como se esperaba, el cultivo conjunto de CTL CD8⁺ I y de MC CAR con linfocitos T CD4⁺ I CAR dio como resultado una proliferación específica de tumor significativamente mayor del subconjunto CD8⁺ en comparación con el cultivo conjunto con linfocitos T CD4⁺ de MC o ME CAR, o CTL CD8⁺ CAR solo (Figura 9). De todas las combinaciones, se observó máxima proliferación del CTL CD8⁺ CAR en respuesta a la estimulación con células tumorales positivas para ROR1 después del cultivo conjunto de linfocitos T CD4⁺ I CAR con CTL CD8⁺ CM CAR (Figura 9). En conjunto, los presentes datos demuestran que existen diferencias intrínsecas entre linfocitos T CD4⁺ I, de MC y de ME en su perfil de citocinas y potencial proliferativo, con mayor producción de IL-2 y mayor proliferación en linfocitos T CD4⁺ I. Los presentes datos sugieren que los linfocitos T CD4⁺ I en lugar de los de MC, de ME o en masa, purificados por clasificación, pueden ser los más adecuados para aumentar la función efectora de CTL CD8⁺, y complementan trabajos previos en linfocitos T CD8⁺ que proceden de linfocitos T CD8⁺ de MC que poseen características favorables para usar en inmunoterapia adoptiva.

Discusión

En conjunto, estos datos demuestran que la transferencia adoptiva de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ modificados con ROR1-CAR confieren potentes respuestas antitumorales en un modelo *in vivo* de linfoma sistémico agresivo y proporcionan evidencia de un efecto beneficioso y sinérgico de linfocitos T CD4⁺ CAR sobre la eficacia antitumoral de CTL CD8⁺ CAR. Los presentes datos ilustran cómo el análisis de las cualidades intrínsecas de las células puede informar el diseño racional de productos celulares que contienen linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ específicos de tumores para mejorar los resultados de la inmunoterapia contra el cáncer.

Ejemplo 5 - Modelo de tumor de ratón de linfoma sistémico de células del manto (NSG/Jeko-1-ffLuc)

Se examinó el efecto de proporcionar CD4 auxiliar sobre la eficacia antitumoral de CTL CD8⁺ modificado con ROR1-CAR en un modelo *in vivo* de linfoma sistémico agresivo de células del manto.

Materiales y métodos

Se injertaron ratones NOD/SCID/gamma^{-/-} (NSG) irradiados de forma subletal mediante inyección en la vena de la cola con 5x10⁵ células Jeko-1 que se habían transfectado de forma estable con luciferasa de luciérnaga (Jeko-1/ffLuc) para permitir la evaluación de la carga y distribución del tumor utilizando imágenes de bioluminiscencia. Se confirmó el injerto estable (tasa de aceptación = 100 %) y el desarrollo de linfoma diseminado rápidamente progresivo en ratones NSG en estas condiciones. Después del injerto del tumor, los grupos de 3 ratones recibieron CTL CD8⁺ CAR (grupo 1), linfocitos T CD4⁺ CAR (grupo 2), una combinación de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ transducidos con ROR1-CAR (grupo 3), linfocitos T no transducidos de control (grupo 4, 5, 6) mediante inyección en la vena de la cola o sin tratamiento (grupo 7). El número total de linfocitos T transferidos fue de 10x10⁶ en todos los casos. Se obtuvieron hemorragias oculares de los ratones 2 días después de la transferencia adoptiva y se confirmó la presencia de linfocitos T transducidos con ROR1-CAR o no transducidos en la sangre periférica.

Resultados

El día 6 después de la transferencia de linfocitos T, se tomaron imágenes de bioluminiscencia para evaluar la carga tumoral. El efecto antitumoral más fuerte se observó en ratones que recibieron la combinación de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ ROR1-CAR, con una reducción de > 2 log en la señal de bioluminiscencia en comparación con el grupo de control (Figura 10). También se observó un fuerte efecto antitumoral en ratones que recibieron linfocitos T CD8⁺ o CD4⁺ modificados con ROR1-CAR, con una reducción de > 1 log en la señal de bioluminiscencia en comparación con los controles (Figura 10). Cabe destacar que, la reducción de la carga tumoral después de la administración de la combinación de linfocitos T CD8⁺/CD4⁺ CAR fue mayor que la de los grupos de CTL CD8⁺ CAR y linfocitos T D4⁺ CAR combinados lo que sugiere que los linfocitos T CD4⁺ CAR y los CTL CD8⁺ CAR trabajaban sinérgicamente.

Discusión

En conjunto, estos datos demuestran que la transferencia adoptiva de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ modificados con ROR1-CAR confieren potentes respuestas antitumorales en un modelo *in vivo* de linfoma sistémico agresivo y proporcionan evidencia de un efecto beneficioso y sinérgico de linfocitos T CD4⁺ CAR sobre la eficacia antitumoral de CTL CD8⁺ CAR. Los presentes datos ilustran cómo el análisis de las cualidades intrínsecas de las células puede informar el diseño racional de productos celulares que contienen linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ específicos de tumores para mejorar los resultados de la inmunoterapia contra el cáncer.

Ejemplo 6 - Los linfocitos T CD19 CAR exhiben la misma sinergia

Se examinó el efecto de proporcionar CD4 auxiliar sobre la eficacia antitumoral de CTL CD8⁺ modificado con CD19 en cultivo conjunto *in vitro* y en un modelo *in vivo* de linfoma de células del manto sistémico agresivo.

Materiales y métodos

Se pueden preparar linfocitos T CD19 CAR como se describe en el documento US 2008/0131415.

Ensayo de cultivo conjunto

Se marcaron linfocitos T CD4⁺ transducidos con CD19-CAR y linfocitos T citotóxicos CD8⁺ transducidos con CD19-CAR con CFSE y se cultivaron conjuntamente en una proporción de 2:1, 1:1 y 1:2. A continuación, los cultivos conjuntos se estimularon con células K562/ROR1 y células K562 de control y se midió la proliferación celular mediante un ensayo de dilución de tinte CFSE después de 5 días de incubación. Para análisis de flujo, las muestras se tiñeron con AcM anti-CD8 y anti-CD4 conjugados para distinguir los subconjuntos CD8⁺ y CD4⁺.

Modelo *in vivo*

Se injertaron ratones NOD/SCID/gamma^{-/-} (NSG) irradiados de forma subletal mediante inyección en la vena de la cola con 5x10⁵ células Jeko-1 que se habían transfectado de forma estable con luciferasa de luciérnaga (Jeko-1/ffLuc) para permitir la evaluación de la carga y distribución del tumor utilizando imágenes de bioluminiscencia. Se confirmó el injerto estable (tasa de aceptación = 100 %) y el desarrollo de linfoma diseminado rápidamente progresivo en ratones NSG en estas condiciones. Después del injerto del tumor, los grupos de 3 ratones recibieron CTL CD8⁺ CD19 CAR (grupo 1), linfocitos T CD4⁺ CD19 CAR (grupo 2), una combinación de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ transducidos con CD19CAR (grupo 3), linfocitos T no transducidos de control (grupo 4, 5, 6) mediante inyección en la vena de la cola o sin tratamiento (grupo 7). El número total de linfocitos T transferidos fue de 10x10⁶ en todos los casos. Se obtuvieron hemorragias oculares de los ratones 2 días después de la transferencia adoptiva.

Resultados

La Figura 10 muestra la capacidad superior de líneas de linfocitos T CD4⁺ CAR procedentes del subconjunto indiferenciado para aumentar la proliferación específica de tumor de CTL CD8⁺ CAR procedentes de memoria central en experimentos de cultivos conjuntos con CTL CD8⁺ CD19-CAR y líneas de linfocitos T CD4⁺ CD19-CAR, estimulados con la línea tumoral de linfoma de células del manto CD19⁺ Jeko-1. Aunque, las líneas de linfocitos T CD4⁺ CAR procedentes del subconjunto de memoria central o efectora aumentan la proliferación específica de tumor de CTL CD8⁺ CAR procedentes de memoria central en mucho menos grado.

La Figura 11 muestra que los linfocitos T CD8⁺ CAR y los linfocitos T CD4⁺ CAR confieren independientemente eficacia antitumoral directa en un modelo de linfoma en ratones inmunodeficientes (NOD/SCID-Raji). Los ratones recibieron linfocitos T procedentes de CD8⁺ de memoria central transducidos con CD19-CAR o transducidos de forma simulada de control (A) o procedentes de CD4⁺ indiferenciados transducidos con CD19-CAR o transducidos de forma simulada de control (B).

La Figura 12 muestra el aumento y el efecto sinérgico de los linfocitos T CD4⁺ modificados con ROR1-CAR sobre la eficacia antitumoral de CTL CD8⁺ ROR1-CAR en un modelo de tumor de ratón de linfoma sistémico de células del manto (NSG/Jeko-1-ffLuc). La eficacia antitumoral de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ modificados con ROR1-CAR en un modelo de tumor de ratón de linfoma de células del manto sistémico agresivo (NSG/Jeko-1) mejoró en comparación con la población celular sola o en comparación con células no transducidas.

La Figura 13 muestra la sinergia de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ CD19-CAR en un modelo de ratón de linfoma sistémico (NSG/Raji). El injerto del tumor Raji se confirmó mediante formación de imágenes de bioluminiscencia el día 6 después de la inoculación del tumor (antes del tratamiento) (esquema de tratamiento mostrado en A, injerto de tumor mediante bioluminiscencia mostrado en B). El análisis de la carga tumoral utilizando imágenes de bioluminiscencia mostró erradicación completa de los tumores Raji en las cohortes de ratones tratados con linfocitos T CD8⁺ CD19-CAR, y en ratones tratados con el producto combinado de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ CD19-CAR (después del tratamiento, medio, barras negras y grises) B). A continuación, los ratones se expusieron a un segundo inóculo de células tumorales Raji y se analizó la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ CAR en la sangre periférica, y el injerto tumoral. En ratones tratados con un producto combinado de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ CAR, niveles significativamente más altos de linfocitos T CD8⁺ CAR después de la exposición tumoral (C, paneles inferiores) y rechazo completo del inóculo de Raji (después de la exposición tumoral, barra gris derecha, B). Por el contrario, en ratones que habían recibido CTL CD8⁺ CD19-CAR solo, no se detectó un aumento en linfocitos T CAR después de la exposición tumoral (C) y las células tumorales Raji pudieron injertarse (después de la exposición tumoral, barra negra derecha, panel B).

Discusión

En conjunto, estos datos demuestran que la transferencia de las células con linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ modificados con otra construcción CAR, CD19, CD19-CAR confieren potentes respuestas antitumorales en un modelo *in vivo* de linfoma sistémico agresivo y proporcionan evidencia de un efecto beneficioso y sinérgico de linfocitos T CD4⁺ CAR sobre la eficacia antitumoral de CTL CD8⁺ CAR.

Lo anterior es ilustrativo de la presente invención y no debe interpretarse como una limitación de la misma. La invención se define según las siguientes reivindicaciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cheever, M. A., *et al.*, Specificity of adoptive chemoimmunotherapy of established syngeneic tumors. J. Immunol. 125, 711-714 (1980).
2. Pahl-Seibert, M.-F. *et al.* Highly protective *in vivo* function of cytomegalovirus IE1 epitope-specific memory CD8 T cells purified by T-cell receptor-based cell sorting. J. Virol. 79, 5400-5413 (2005).
3. Riddell, S. R. *et al.* Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. Science 257, 238-241 (1992).
4. Walter, E. A. *et al.* Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. N. Engl. J. Med. 333, 1038-1044 (1995).
5. Rooney, C. M. *et al.* Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. Blood 92, 1549-1555 (1998).
6. Dudley, M. E. *et al.* Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. Science 298, 850-854 (2002)/
7. Bollard, C. M. *et al.* Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus+ Hodgkin's disease. J. Exp. Med. 200, 1623-1633 (2004).
8. Dudley, M. E. *et al.* Adoptive cell transfer therapy following nonmyeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. J. Clin. Oncol. 23, 2346-2357 (2005).
9. Gattinoni, L., Powell Jr, D. J., Rosenberg, S. A., y Restifo, N. P. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. Nat. Rev. Immunol. 6, 383-393 (2006).
10. Blattman, J. N. & Greenberg, P. D. Cancer Immunotherapy: A treatment for the masses. Science 305, 200-205 (2004).
11. Kessels, H. W. H. G. *et al.* Immunotherapy through TCR gene transfer. Nat. Immunol. 2, 957-961 (2001).
12. Stanislawski, T. *et al.* Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer. Nat. Immunol. 2, 962-970 (2001).
13. Brentjens, R. J. *et al.* Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. Nat. Med. 9, 279-286 (2003).
14. Morgan, R. A. *et al.* Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. Publicación en línea de Science Advance el 31 de agosto, (2006). DOI: 10.1126/science.1129003
15. Bleakley, M. y Riddell, S. R. Molecules and mechanisms of the graft versus leukemia effect. Nat. Rev. Cancer 4, 371-380 (2004).
16. Dudley, M. E. *et al.* Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. J. Immunother. 24, 363-373 (2001).
17. Yee, C. *et al.* Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8⁺ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: *In vivo* persistence, migration, and antitumor effect of transferred cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 16168-16173 (2002).
18. Sallusto, F. *et al.*, Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. Annu. Rev. Immunol. 22, 745-763 (2004).
19. Butcher, E. C. & Picker, L. J. Lymphocyte homing and homeostasis. Science 272, 60-66 (1996).
20. Dudley, M. E. *et al.* A phase I study of non-myeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. J. Immunother. 25, 243-251 (2002).
22. Gattinoni, L. *et al.* Acquisition of full effector function *in vitro* paradoxically impairs the *in vivo* antitumor efficacy of adoptively transferred CD8⁺ T cells. J. Clin. Invest. 115, 1616-1626 (2005).
23. Schmitt TM, Ciofani M, Petrie HT, Zuniga-Plucker JC. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. J Exp Med. 2004;200(4):469-479.
24. Wang J, Press OW, Lindgren CG, *et al.* Cellular immunotherapy for follicular lymphoma using genetically modified CD20-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. Mol Ther. 2004;9(4): 577-586.
25. Riddell SR, Greenberg PD. The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. J Immunol Methods. 1990; 128(2):189-201.
26. Baskar S, Kwong KY, Hofer T, *et al.* Unique cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in human B-cell chronic lymphocytic leukemia. Clin Cancer Res. 2008;14(2):396-404.
27. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, *et al.* Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. J Exp Med. 2001;194(11):1625-1638.
28. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, *et al.* Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. J Exp Med. 2001;
29. Fukuda T, Chen L, Endo T, *et al.* Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105(8):3047-3052.

30. Lapalombella R, Andritsos L, Liu Q., *et al.* Lenalidomide treatment promotes CD154 expression on CLL cells and enhances production of antibodies by normal B cells through a PI3-kinase-dependent pathway. *Blood*. 2010; 115(13):2619-2629.
- 5 31. Berger C, Jensen MC, Lansdorp PM, Gough M, Elliott C, Riddell SR. Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J Clin Invest*. 2008;118(1):294-305.
32. Hudecek *et al.*, *Blood* 116:4532, 2010
33. Berger *et al.*, *J. Clin. Invest.* 118:294, 2008
34. Wang *et al.*, *Blood* 117:1888, 2011
- 10 35. Hinrichs *et al.*, *Blood* 117:808, 2011
36. Hinrichs *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 106:17469, 2009

REIVINDICACIONES

1. Una composición de inmunoterapia celular adoptiva que contiene linfocitos T CD4⁺ modificados con receptores quiméricos para antígenos y linfocitos T CD8⁺ modificados con receptores quiméricos para antígenos, en donde:

(a) los linfocitos T CD4⁺ modificados con receptores quiméricos para antígenos en la composición consisten en una población de linfocitos T CD4⁺ auxiliares de una población de linfocitos T CD4⁺ indiferenciados enriquecidos de un sujeto que contienen un receptor quimérico para antígeno que comprende un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para un antígeno asociado a una enfermedad o un trastorno y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T; y

(b) los linfocitos T CD8⁺ modificados con receptores quiméricos para antígenos en la composición consisten en una población de linfocitos T citotóxicos CD8⁺ de una población de linfocitos T CD8⁺ de memoria central enriquecidos del sujeto que contienen un receptor quimérico para antígeno que comprende un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para el antígeno asociado a una enfermedad o un trastorno y un dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T.

2. La composición de inmunoterapia celular adoptiva de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:

(a) los linfocitos T CD4⁺ auxiliares secretan una mayor cantidad de IL-2, TNF α y/o IFN γ y/o exhiben un mayor grado de proliferación cuando se cultivan en presencia del antígeno en comparación con una población de referencia de linfocitos T CD4⁺ expandidos *in vitro* de una población de linfocitos T CD4⁺ de memoria efectora enriquecidos o una población de linfocitos T CD4⁺ en masa del sujeto y modificados para contener el receptor quimérico para antígeno;

(b) un mayor porcentaje de los linfocitos T CD4⁺ auxiliares modificados con receptores quiméricos para antígenos tienen superficie positiva para CD62L y CD45RA en comparación con una población de referencia de linfocitos T CD4⁺ expandidos *in vitro* de una población de linfocitos T CD4⁺ de memoria efectora enriquecidos o una población de linfocitos T CD4⁺ en masa del sujeto y modificados para contener el receptor quimérico para antígeno; y/o

(c) un mayor porcentaje de los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ modificados con receptores quiméricos para antígenos (i) no expresa CD45RA o tiene una expresión disminuida de CD45RA en comparación con linfocitos T indiferenciados y (ii) tiene superficie positiva para CD62L y CD45RO, en comparación con una población de referencia de linfocitos T CD8⁺ expandidos *in vitro* de una población de linfocitos T CD8⁺ de memoria efectora enriquecidos o una población de linfocitos T CD8⁺ en masa del sujeto y modificados para contener el receptor quimérico para antígeno.

3. La composición de inmunoterapia celular adoptiva de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el dominio de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T del receptor quimérico para antígeno comprende un dominio de señalización intracelular de CD3, que, opcionalmente, comprende además un dominio coestimulador de CD28 o un dominio coestimulador de 4-1BB.

4. La composición de inmunoterapia celular adoptiva de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde

(a) el dominio de señalización intracelular de los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ es el mismo que el dominio de señalización intracelular de los linfocitos T auxiliares CD4⁺;

(b) el dominio de señalización intracelular de los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ es diferente del dominio de señalización intracelular de los linfocitos T auxiliares CD4⁺;

(c) el receptor quimérico para antígeno de los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ es el mismo que el receptor quimérico para antígeno de los linfocitos T auxiliares CD4⁺; o

(d) el receptor quimérico para antígeno de los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ es diferente del receptor quimérico para antígeno de los linfocitos T auxiliares CD4⁺.

5. La composición de inmunoterapia celular adoptiva de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el antígeno está asociado a una enfermedad o un trastorno seleccionados de un tumor sólido, neoplasias hematológicas, melanoma o infección por un patógeno.

6. La composición de inmunoterapia celular adoptiva de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el antígeno es de un receptor de tirosina cinasa huérfano ROR1, tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, mesotelina, CEA, antígeno HIV, antígeno HCV, antígeno HBV, antígeno CMV, antígeno parasitario o antígeno de superficie de la hepatitis B.

7. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para usar en un tratamiento de inmunoterapia adoptiva del cáncer o de una enfermedad infecciosa.

8. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el cáncer se selecciona de un tumor sólido, una neoplasia hematológica o un melanoma.

9. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la enfermedad infecciosa es una infección vírica seleccionada de una infección con un virus de la hepatitis, un virus del herpes, un retrovirus o un flavivirus.
- 5 10. La composición para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde los linfocitos T auxiliares CD4+ modificados con receptores quiméricos para antígenos son capaces de provocar reconocimiento directo de antígeno y aumentar la función efectora de los linfocitos T citotóxicos CD8+ modificados con receptores quiméricos para antígenos.
- 10 11. La composición para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en donde la preparación celular de linfocitos T citotóxicos modificados con receptores quiméricos para antígenos contiene al menos un 80 % de linfocitos T citotóxicos CD8+ de memoria central modificados.

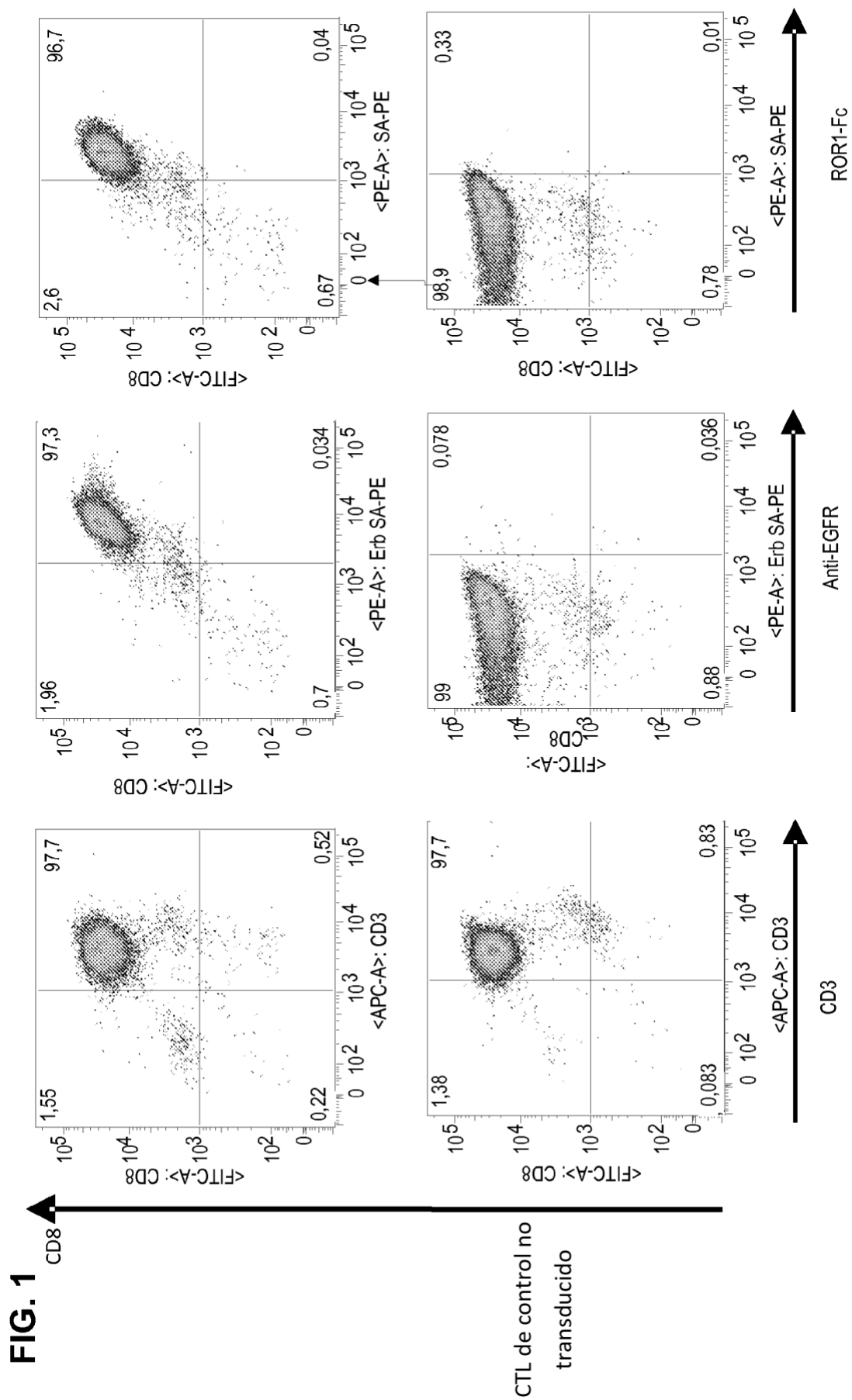


FIG. 2

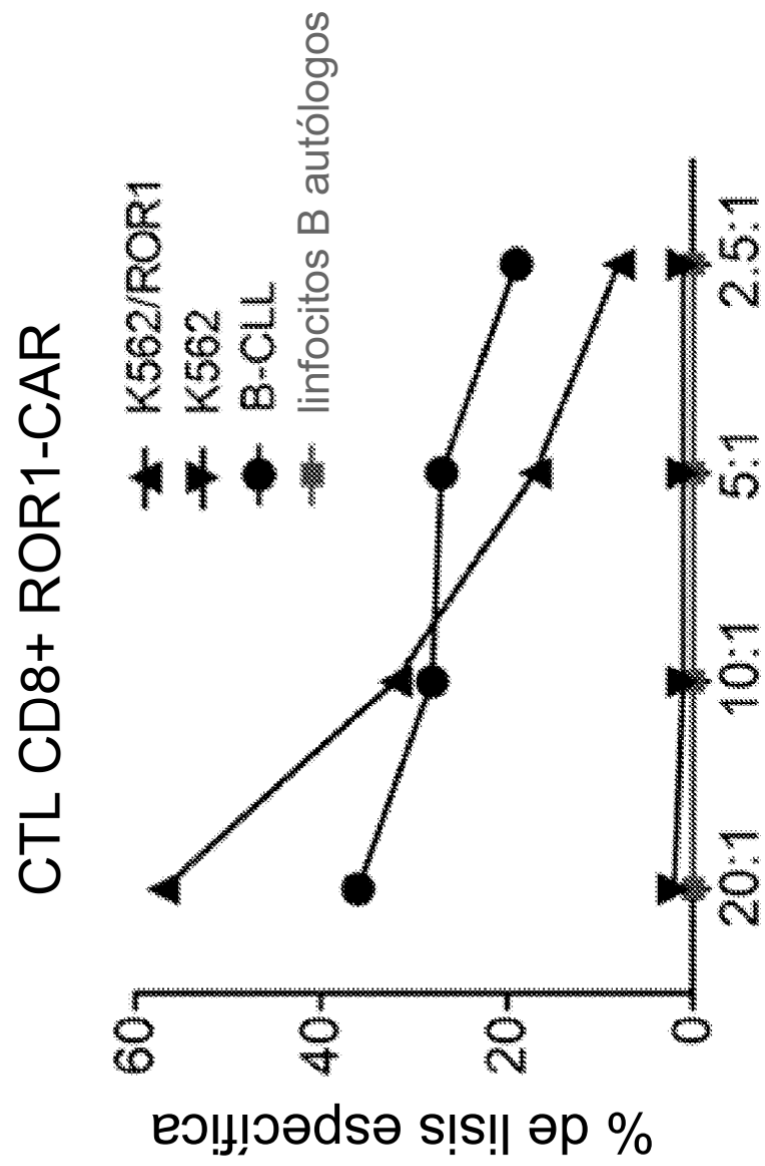


FIG. 3

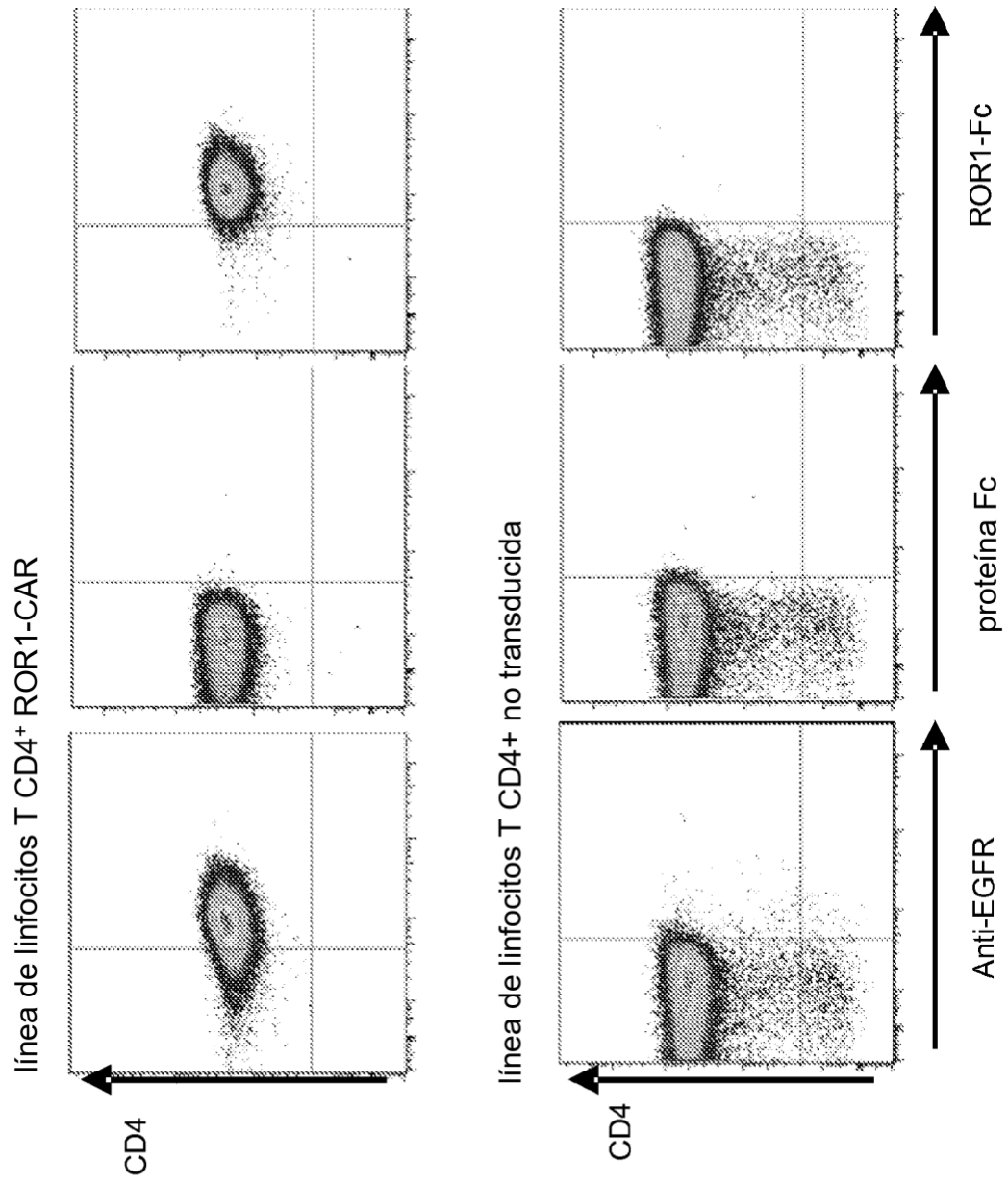
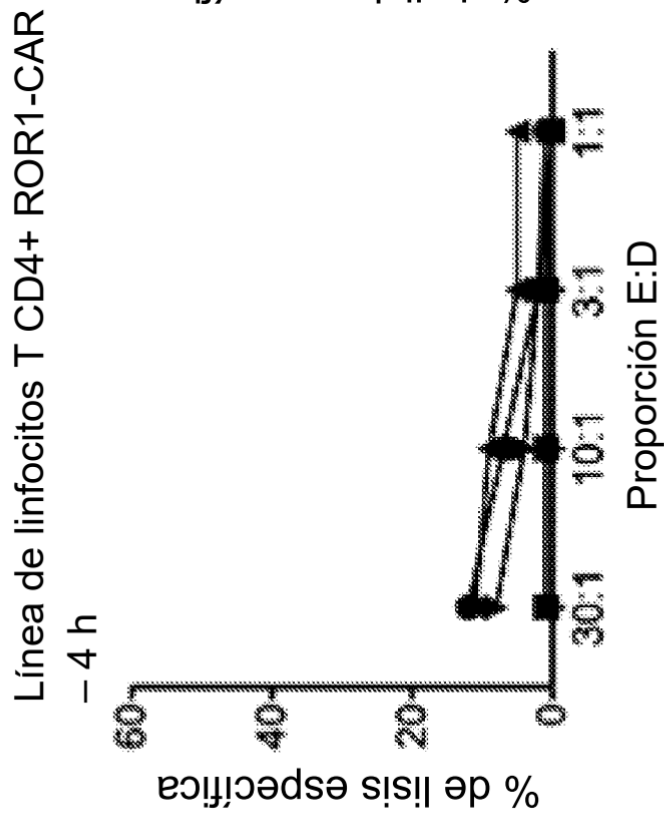


FIG. 4A



Triángulo (arriba) - Jeko-1 (linfoma de células del manto)
 Círculos - K562/ROR1
 Triángulo (abajo) - CLL primaria
 Cuadrados - K562

FIG. 4B

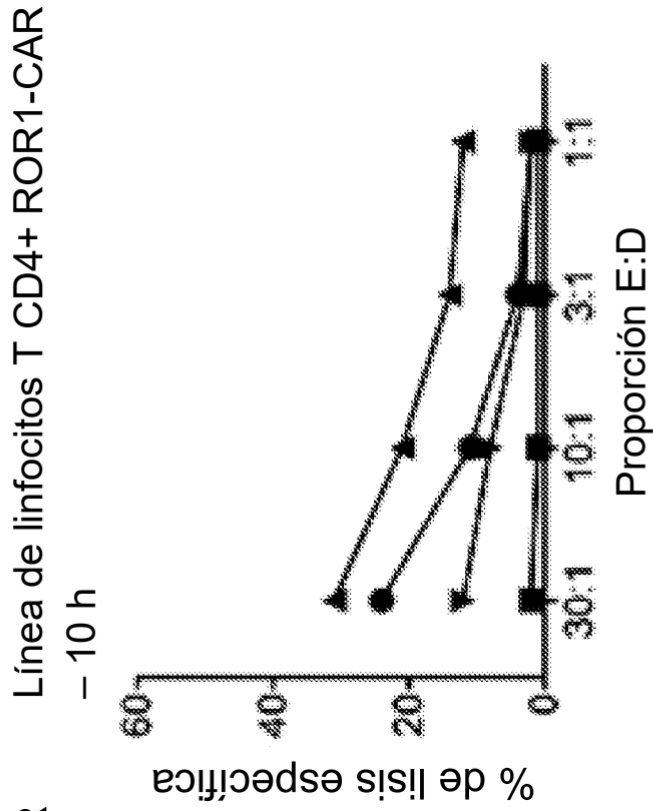


FIG. 5A

ELISA de IFN γ

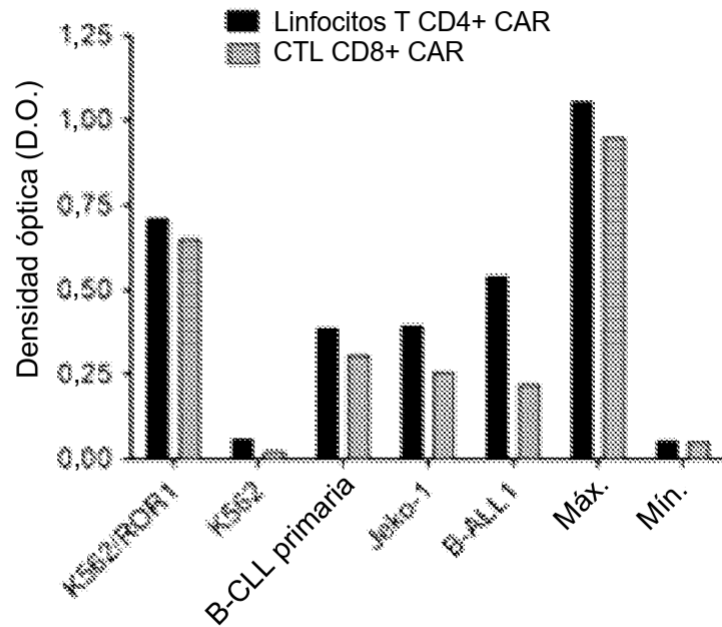


FIG. 5B

Ensayo de citocinas múltiple (Luminex)

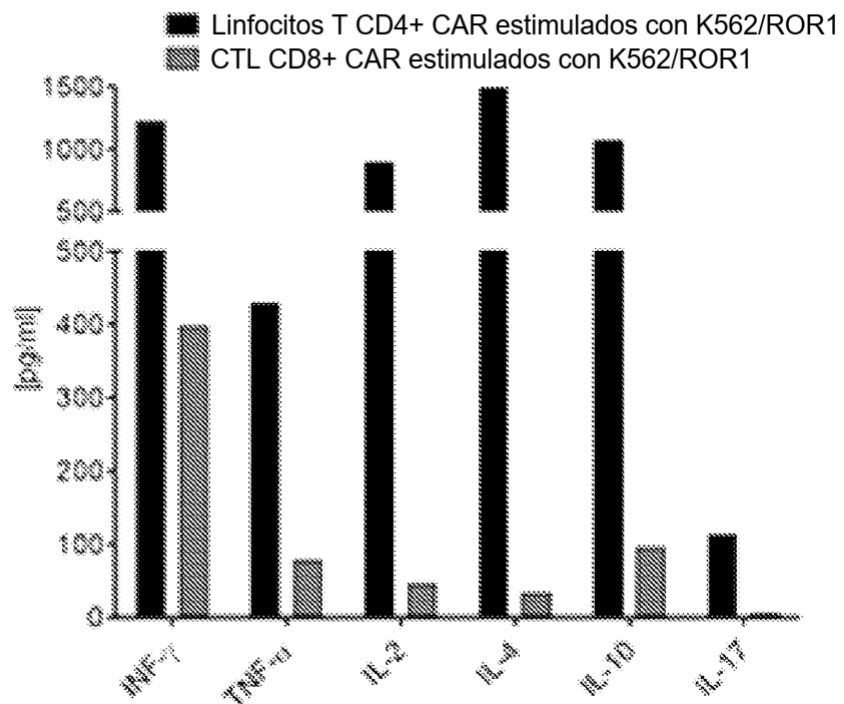
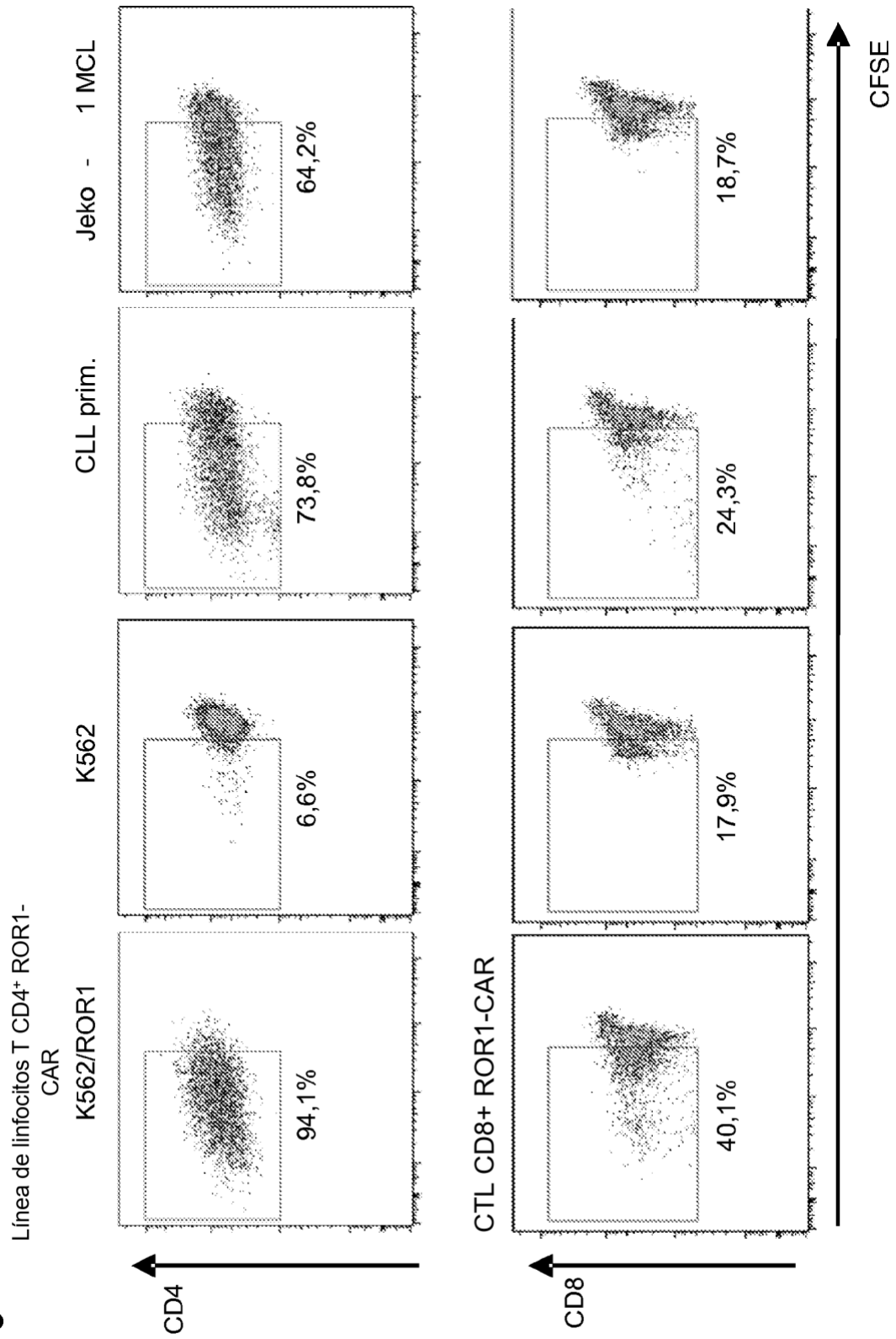


FIG. 6



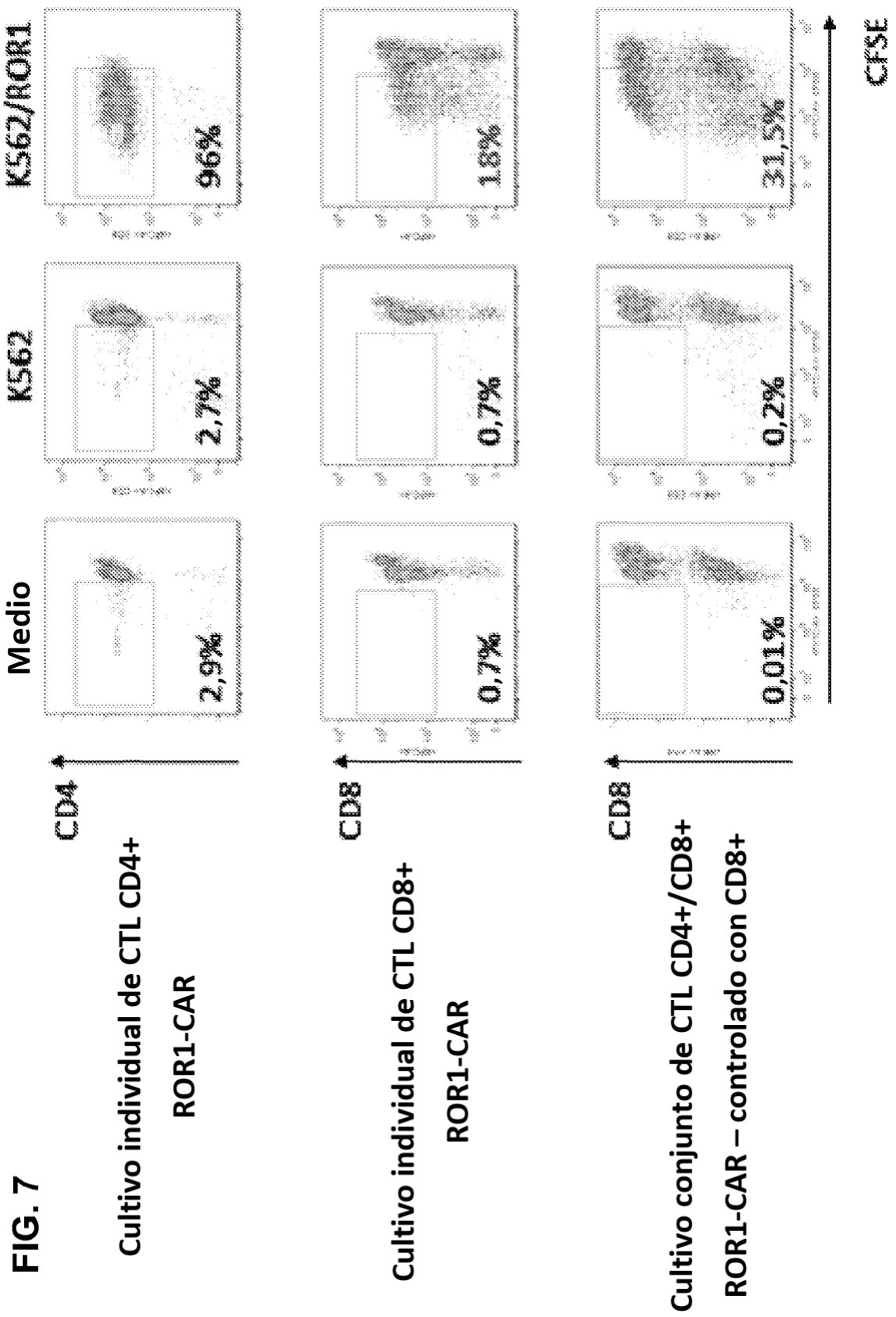


FIG. 8A

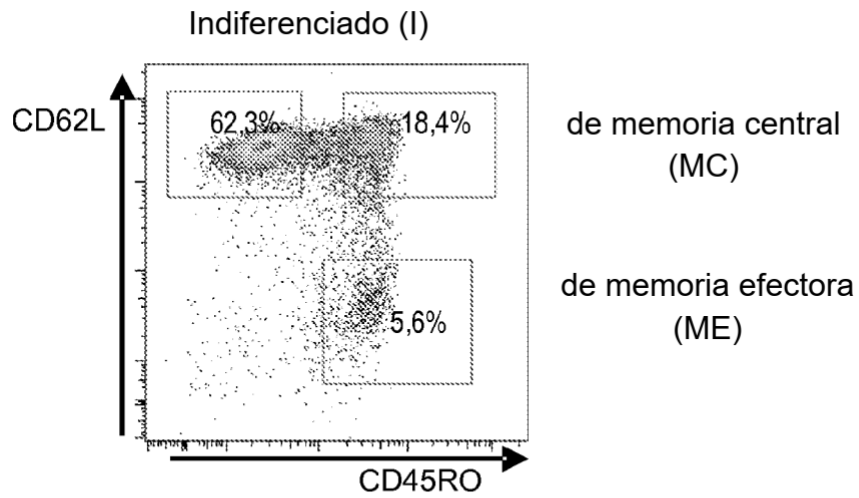


FIG. 8B

Ensayo CFSE – estimulación con K562/ROR1

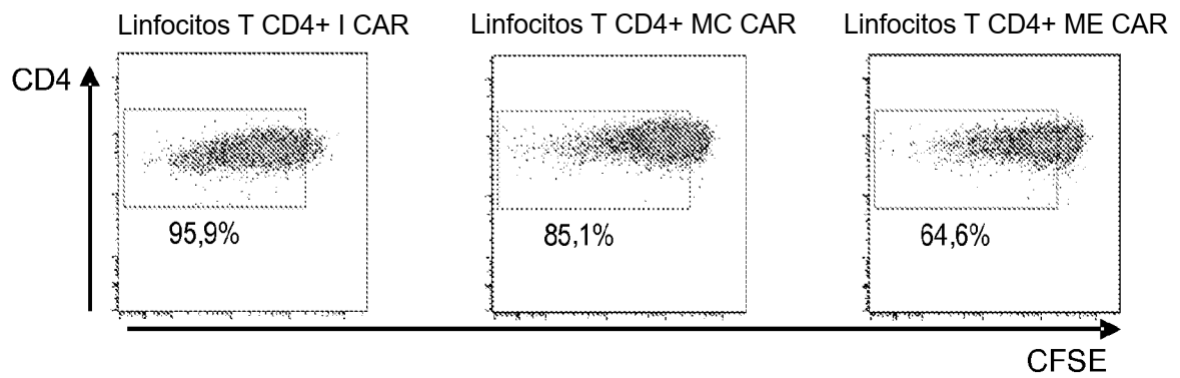


FIG. 8C

Ensayo Luminex – estimulación con K562/CD19

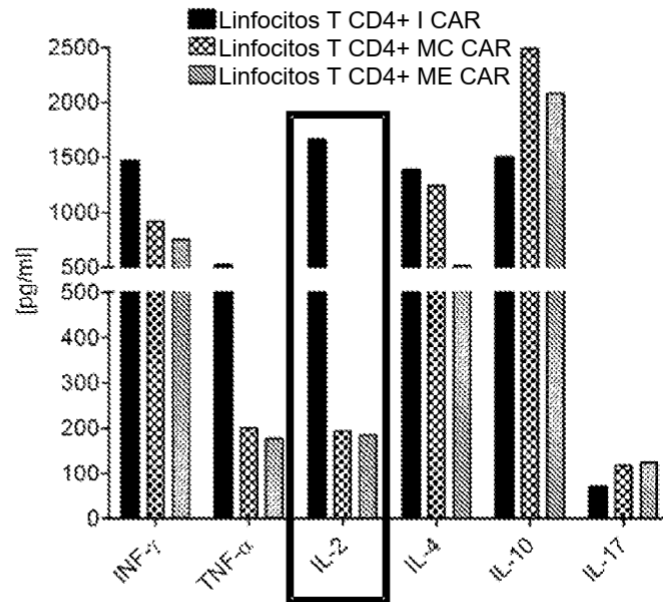


FIG. 8D

Ensayo Luminex – estimulación con K562/CD19

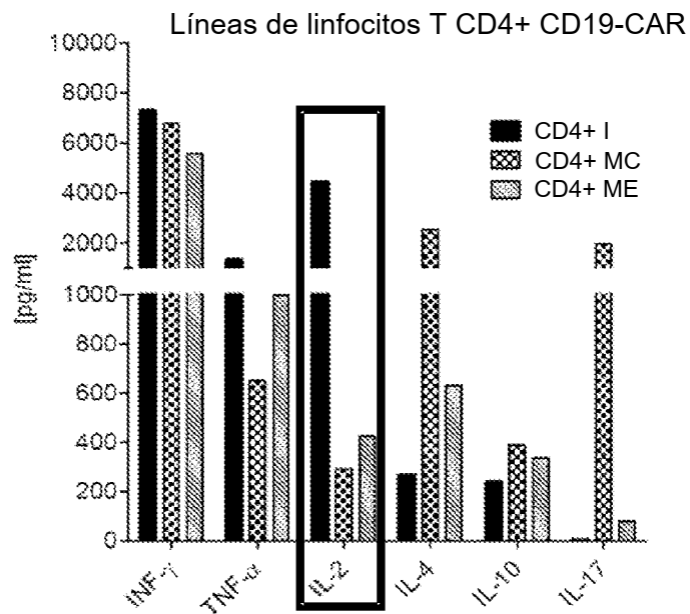


FIG. 9

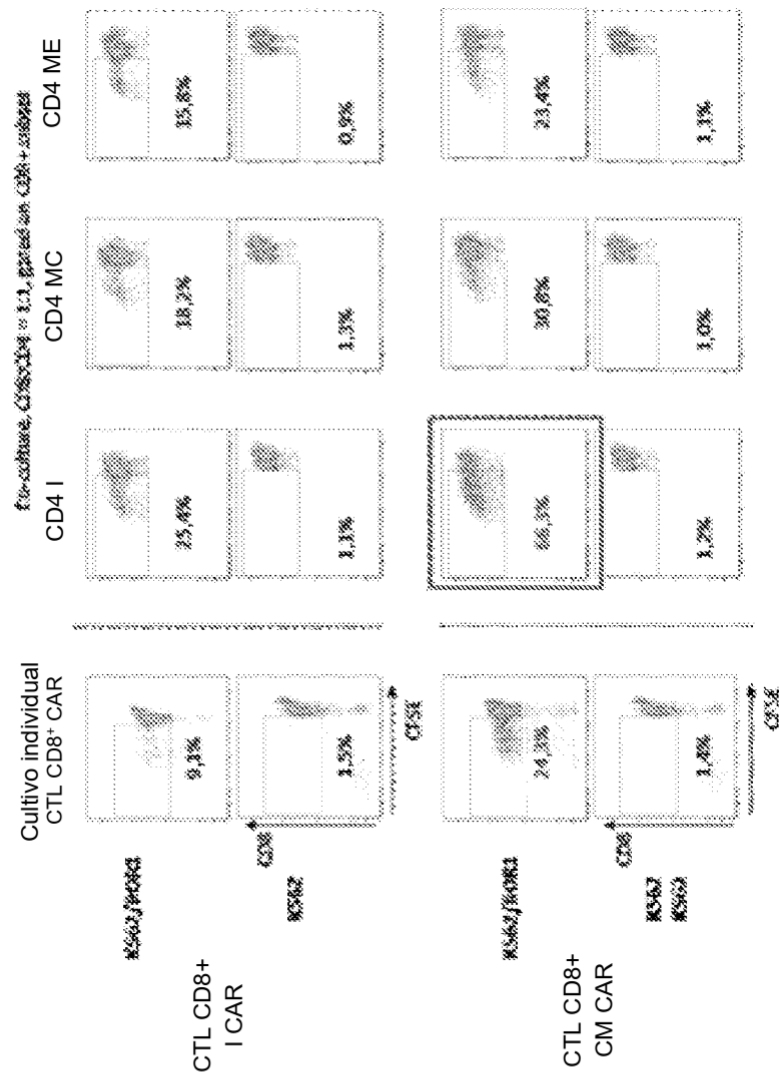


FIG. 10

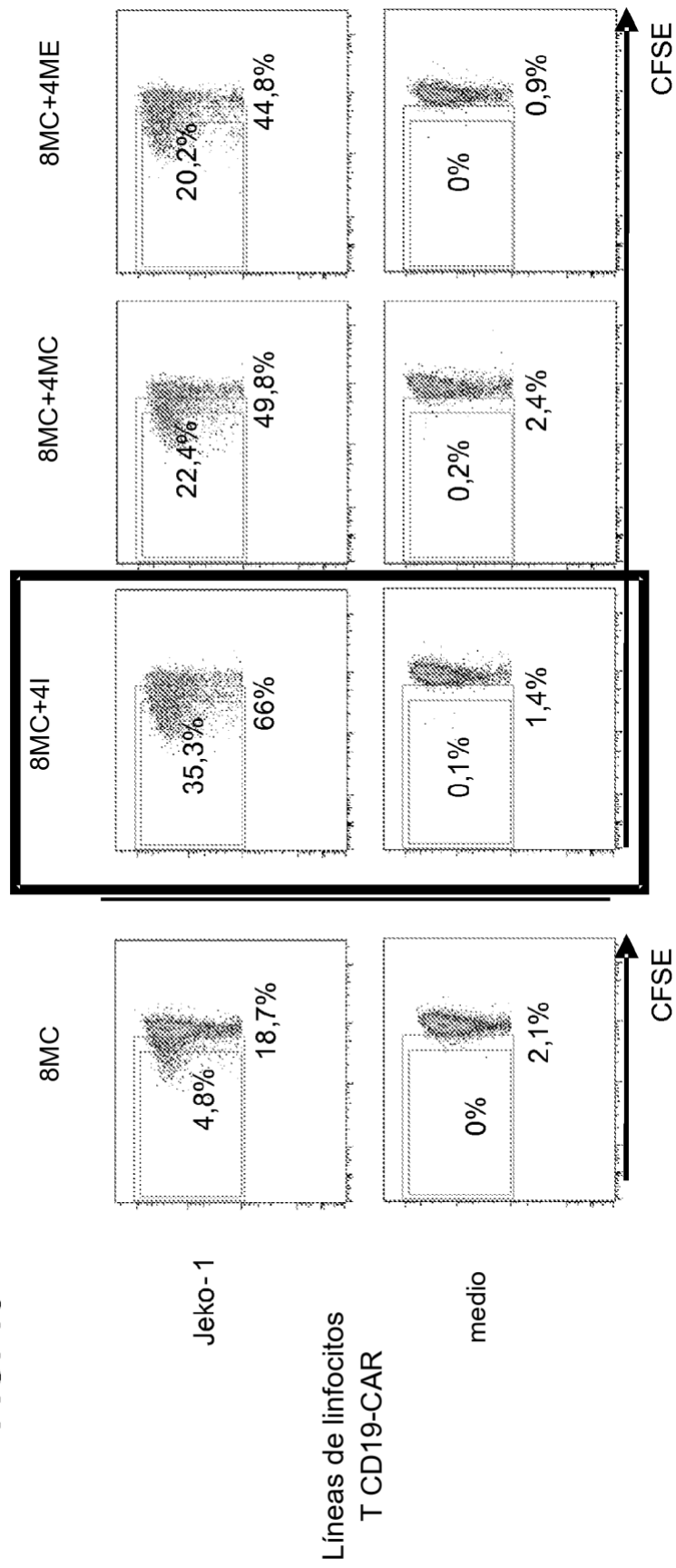
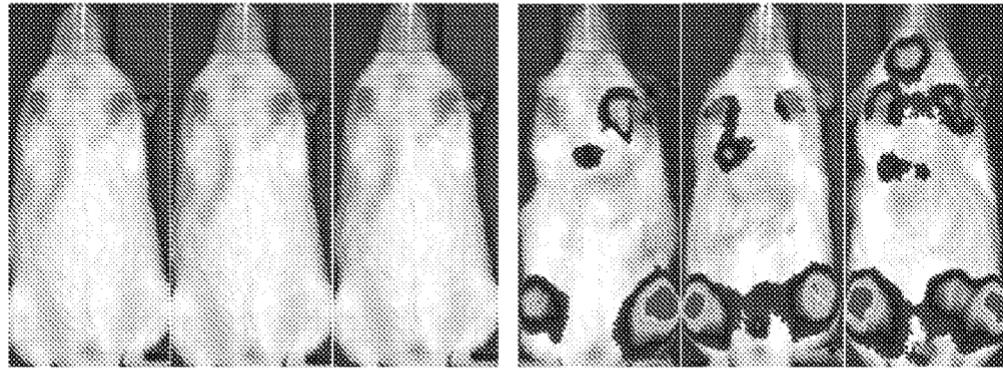
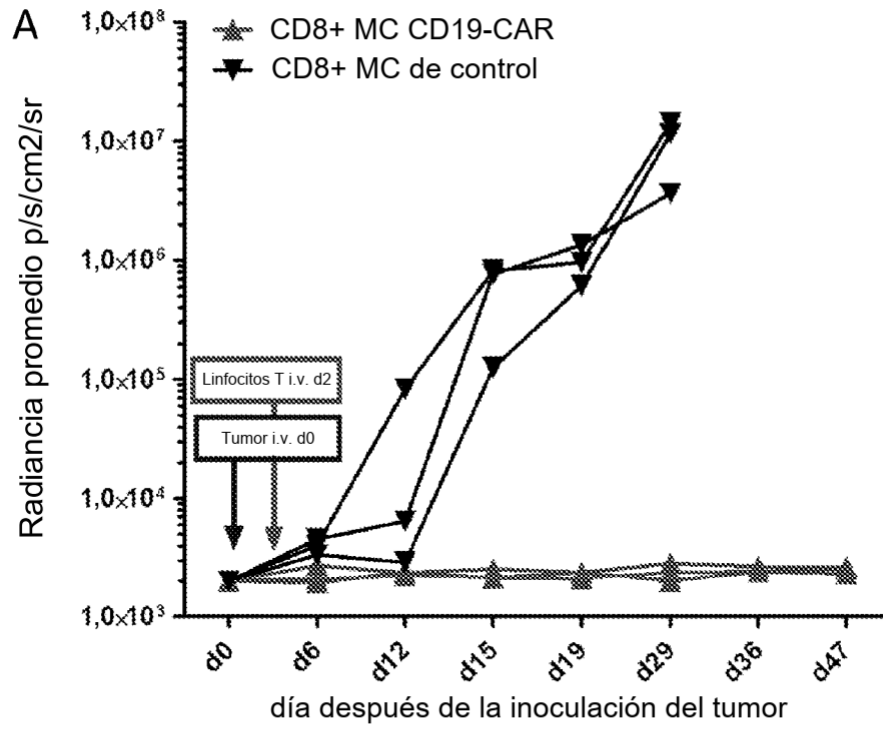


FIG. 11A



CD8+ MC CD19 -

CD8+ C
d19 después de la infusión
de linfocitos T

FIG. 11B

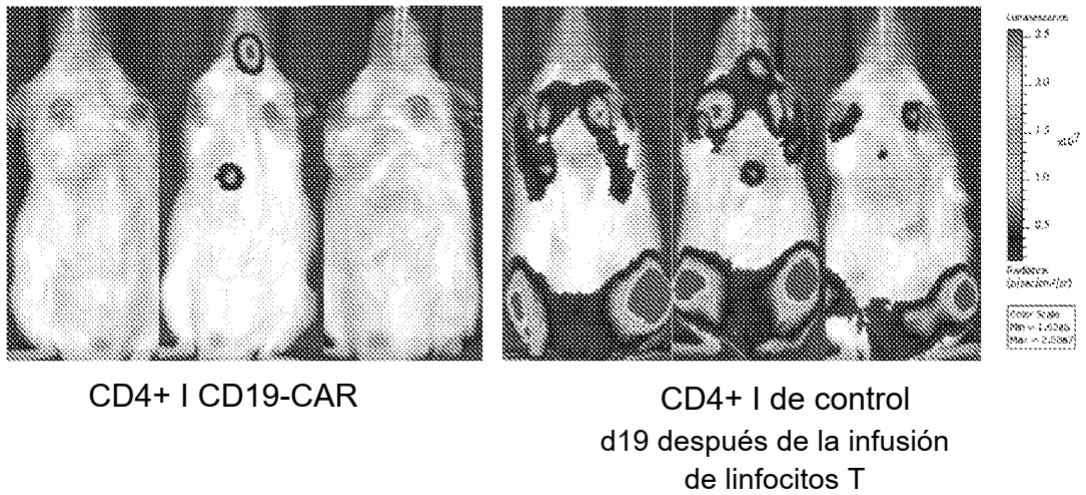
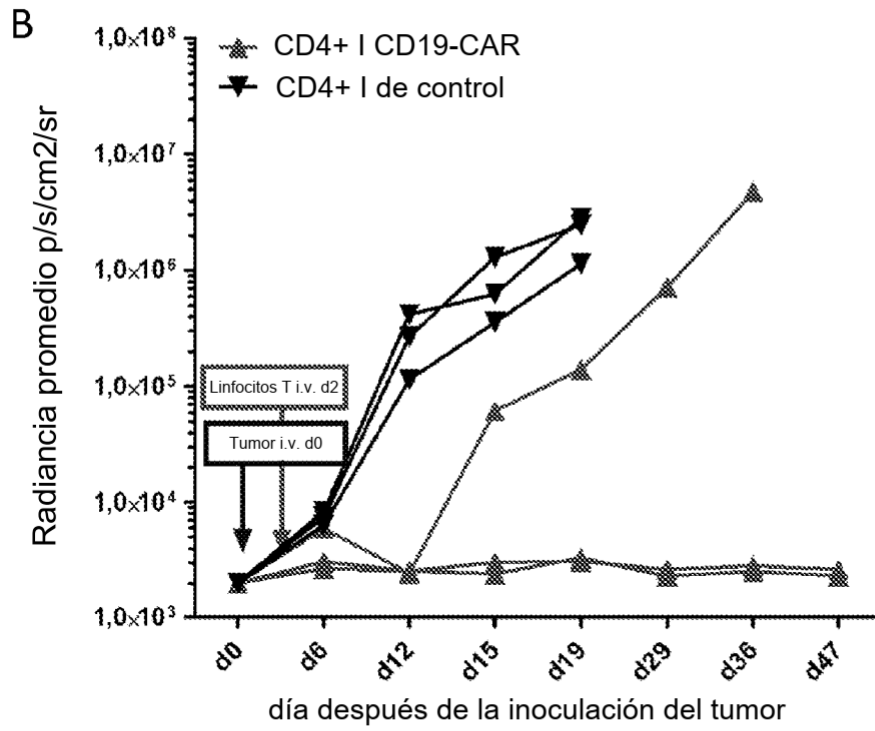


FIG. 12

Tratamiento con:

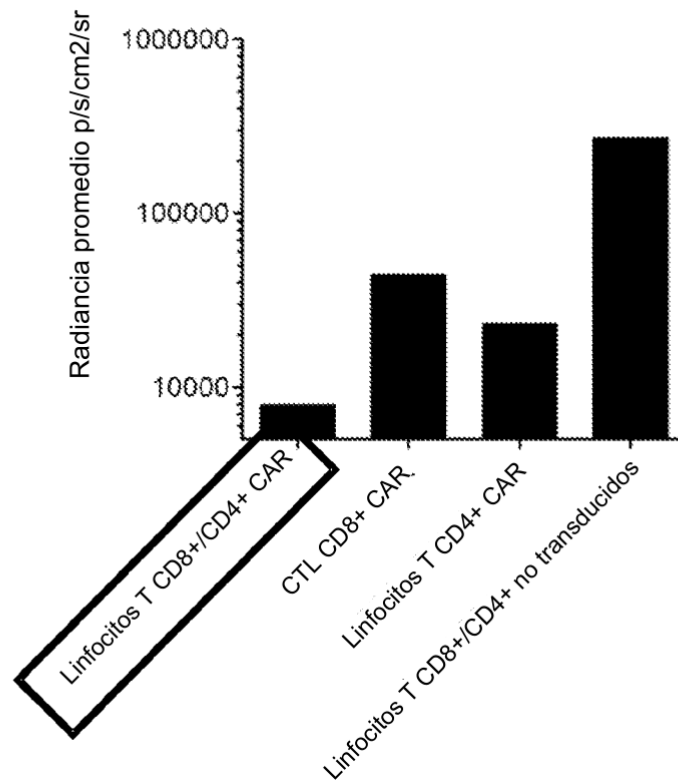
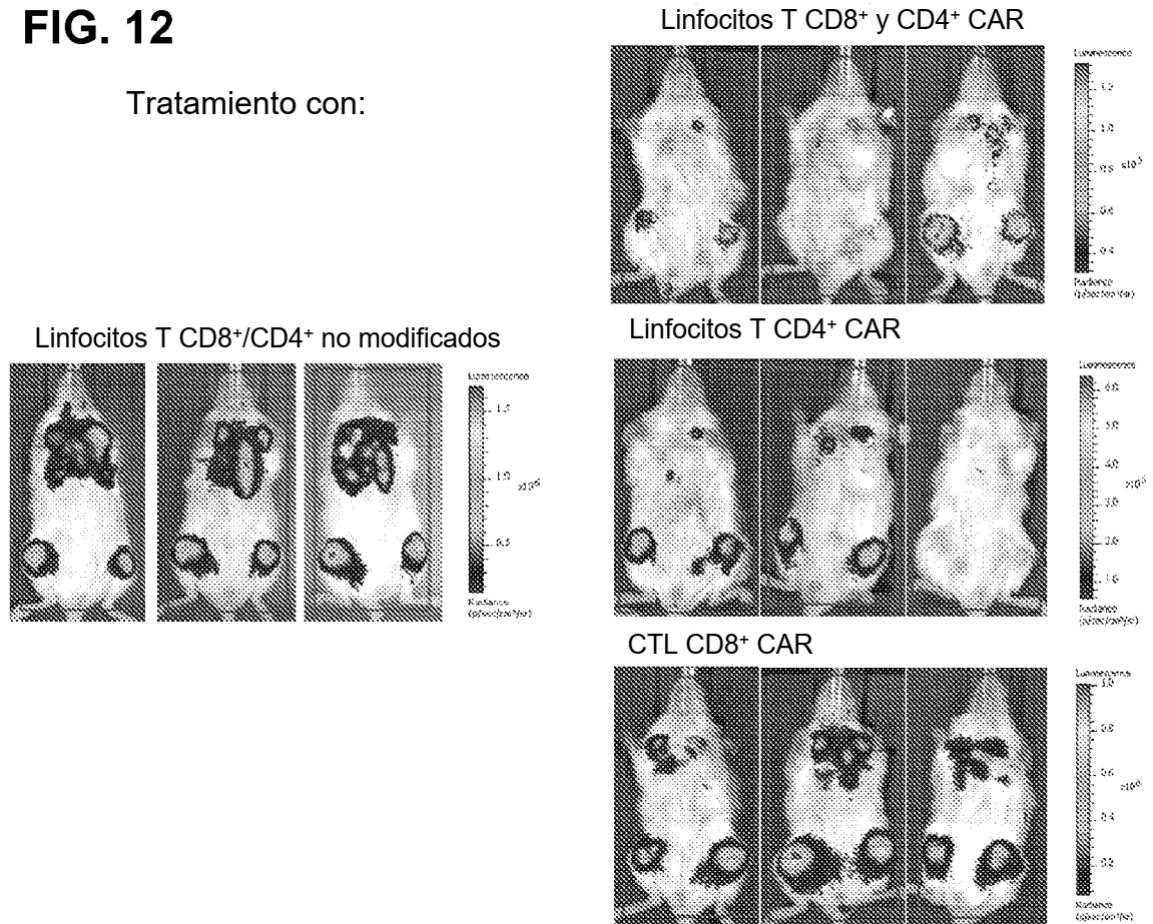


FIG. 13A

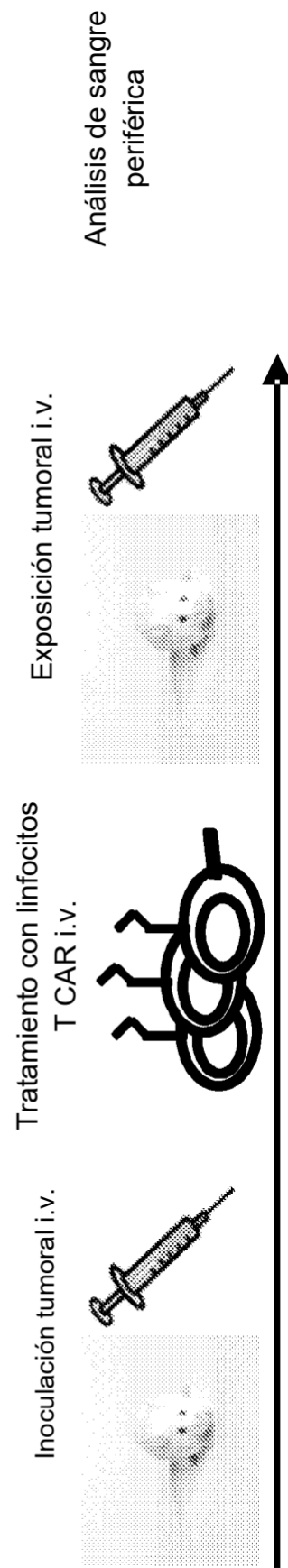


FIG. 13B

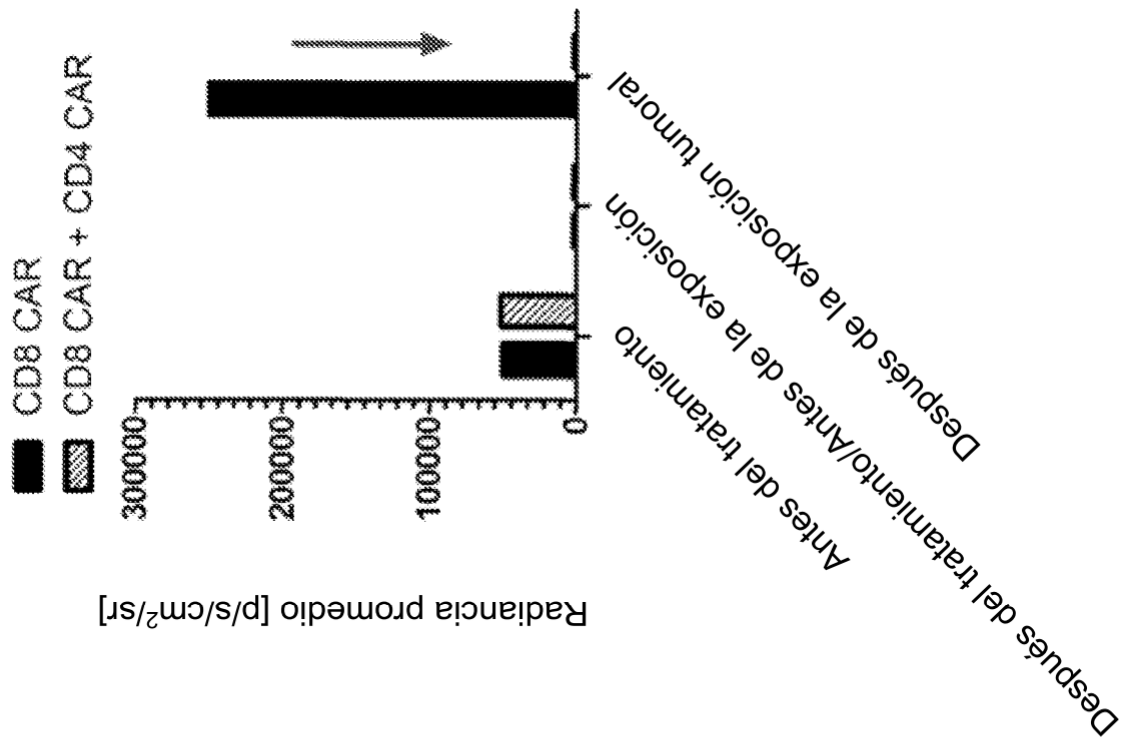


FIG. 13C

Ratón tratado con
linfocitos T CD8+
CAR solo

