

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 979 232**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 35/17** (2015.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**C12N 5/0783** (2010.01)  
**C07K 19/00** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2018** **PCT/EP2018/058367**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2018** **WO18178377**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2018** **E 18715024 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2024** **EP 3592379**

54 Título: **Células inmunitarias con receptor de antígeno quimérico anti-CD22 universal**

30 Prioridad:

**31.03.2017 DK PA201770239**  
**31.03.2017 DK PA201770240**  
**30.06.2017 DK PA201770542**  
**19.10.2017 WO PCT/EP2017/076800**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.09.2024**

73 Titular/es:

**CELLECTIS SA (100.0%)**  
**8 Rue de la Croix Jarry**  
**75013 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**SMITH, JULIANNE;**  
**DUCHATEAU, PHILIPPE y**  
**DERRIEN, MURIELLE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

Observaciones:

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

ES 2 979 232 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

Células inmunitarias con receptor de antígeno quimérico anti-CD22 universal

### Campo de la invención

La presente invención se refiere de manera general al campo de la inmunoterapia, y más específicamente a una célula modificada con inactivación del receptor de células T humanas (TCR KO, por sus siglas en inglés) dotadas de un receptor de antígeno quimérico (CAR, por sus siglas en inglés) específico para CD22 (UCART 22), un interruptor de seguridad, preferentemente expresado en la superficie celular, comprendiendo dicho CAR anti-CD22 (CAR CD22): i) por lo menos un dominio extracelular que comprende: - un dominio bisagra de CD8alfa, - un dominio de unión a antígeno específico para CD22, opcionalmente una secuencia líder, ii) un dominio transmembranal de CD8alfa, y iii) un dominio de señalización intracelular; en donde dicho CAR CD22 presenta una secuencia polipeptídica con una identidad de por lo menos 80 % respecto a la secuencia SEC ID n.º 15, comprendiendo dicho interruptor de seguridad: -un RQR8 unido temporalmente al CAR CD33 mediante el péptido 2A, o - por lo menos dos epítopos específicos del mAb (anticuerpo monoclonal) rituximab, preferentemente situados entre el VH y el dominio bisagra, o 3 epítopos específicos del mAb rituximab o 3 epítopos específicos del mAb rituximab y un epítipo específico de mAb de QBEN-10 unido a CAR CD22. Los receptores UCART 22 resultan útiles en pacientes que podrían ser (o no) el donante inicial de células (células inmunitarias humanas primarias modificadas CAR CD22 «alógenicas» o «autólogas») como un tratamiento para los cánceres hemáticos recaídos/refractarios. Las células que expresan un CAR CD22 según la invención resultan particularmente eficientes y seguras para la inmunoterapia, en particular contra el cáncer agresivo o recaído.

### Antecedentes de la invención

Se esperaba que se produjeran más de 45.000 muertes por cáncer hemático (linfoma no de Hodgkin o leucemia) en los Estados Unidos en 2000 (Greenlee et al., CA Cancer J. Clin., 50:7-33 (2000)). Los datos publicados en 2014 fueron similares y, a pesar de los avances en los tratamientos, tales como la quimioterapia, el pronóstico para tales cánceres se mantiene básicamente sin cambios (E K Mai, U Bertsch, J Dürig, C Kunz, M Haenel, I W Blau, M Munder, A Jauch, B Schurich, T Hielscher, M Merz, B Huegle-Doerr, A Seckinger, D Hose, J Hillengass, M S Raab, K Neben, H-W Lindemann, M Zeis, C Gerecke, I G H Schmidt-Wolf, K Weisel, C Scheid, H Salwender y H Goldschmidt. Phase III trial of bortezomib, cyclophosphamide and dexamethasone (VCD) versus bortezomib, doxorubicin and dexamethasone (PAD) in newly diagnosed myeloma. Leukemia (19 de marzo de 2015) | doi:10.1038/leu.2015.80.

Único entre los nuevos tratamientos en investigación para dichos cánceres hemáticos es la modificación genética de células con capacidad citolítica, tales como las células T, mediante la transferencia génica de un receptor de antígeno quimérico (CAR) (Jena, Dotti et al. 2010).

Los CAR son receptores sintéticos que consisten en un dominio de direccionamiento que está asociado a uno o más dominios intracelulares de señalización en una única molécula o en múltiples dominios transmembranales formando un multímero. En CAR particulares, la fracción de unión consiste en un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), que comprende los fragmentos variables de un anticuerpo monoclonal unidos mediante un conector. También se han utilizado con éxito fracciones de unión basadas en dominios de receptor o de ligando para preparar los CAR.

Los dominios de señalización de moléculas coestimuladoras del receptor de células T (TCR), así como dominios transmembranales y bisagra particulares, han sido añadidos para formar CAR de segunda y tercera generación, conduciendo a ensayos terapéuticos con éxito en seres humanos. En estos estudios, se redirigieron células T procedentes de un paciente que sufría de un cáncer hemático («líquido») contra células malignas que expresaban, por ejemplo, CD19 o CD22 (June et al., 2011; Haso et al., 2013) y se reinyectaron en el mismo paciente. (Haso W, Lee DW, Shah NN, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Pastan IH, Dimitrov DS, Morgan RA, Fitzgerald DJ, Barrett DM, Wayne AS, Mackall CL, Orentas RJ. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood. 14 de febrero de 2013;121(7):1165-74. doi: 10.1182/blood-2012-06-438002. pub. electr.: 14 de dic. de 2012).

Los métodos que permiten modificar células inmunitarias procedentes de un individuo antes de la reinyección en el mismo individuo (normalmente que sufre un cáncer) no están bien adaptados en particular para formas agresivas de cánceres que pueden ser una carrera contra el tiempo. Además, dicho método puede resultar problemático o incierto en pacientes cuyo sistema inmunitario está alterado.

Para paliar este problema, recientemente se ha implementado inmunoterapia con células T expresantes de CAR, denominadas «alógenicas» (también denominadas células T universales o «de uso inmediato», en inglés, «off the shelf») y los dos primeros pacientes tratados con estas células todavía están en remisión, aproximadamente dos años después del tratamiento.

Sin embargo, todavía hay aspectos de dicha terapia que podrían mejorarse, tales como la eficiencia en presencia de

fármacos anticélulas T, la eficiencia contra células de cáncer escapadas, la persistencia, los medios de control, etc. En efecto, aparentemente las células de cáncer, mediante regulación negativa de la expresión de antígenos de superficie reconocidos por los CAR, podrían escapar al tratamiento y persistir, a pesar de la persistencia del sistema inmunitario redirigido en los pacientes tratados. Además, uno de los efectos adversos primarios, en ocasiones letal, observado en pacientes tratados con células T autólogas o alogénicas es el síndrome de liberación de citoquinas.

De esta manera, todavía existe una necesidad de desarrollar tratamientos eficientes y seguros para estas patologías, en particular para sus formas agresivas o refractarias/recaídas de los cánceres hemáticos.

#### BREVE DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

En la presente invención, los inventores han desarrollado un nuevo tratamiento eficiente («UCART22») que comprende células T humanas primarias modificadas con por lo menos una delección del gen TRAC, dotadas de un receptor de antígeno quimérico con diana en CD22 y un marcador de seguridad que permite controlar el número de dichas células *in vivo* y, en consecuencia, la actividad de dichas células.

En el nuevo tratamiento eficiente («UCART22») que comprende células T humanas primarias modificadas con por lo menos una delección del gen de TRAC, se contempla por lo menos una delección adicional en los genes de CD52, dCK o microglobulina beta2.

Estos nuevos UCART22 resultan particularmente eficientes para la transferencia adoptiva en pacientes que sufren de una patología mediada por CD22, sea o no dicho paciente el donante inicial de células inmunitarias y esté o no esté dicho paciente ya bajo terapia modificadora de la inmunidad.

Las células UCART22 de la invención son resistentes a por lo menos un fármaco químico o anticuerpo habitualmente utilizado para tratar las patologías mediadas por CD22, tales como Campath y/o análogos de nucleótido purina (ANP). Las células UCART22 de la invención pueden sobrevivir y estar activas en la presencia de dicho fármaco utilizado a una dosis que mata más de 80 % de las células.

Se observan ventajas clínicas significativas e inesperadas de las células inmunitarias primarias UCART22 aisladas modificadas, incluyendo una baja liberación de citoquinas, ninguna o muy leve enfermedad del injerto contra el huésped y todavía una actividad significativa contra las formas refractarias-recaídas de células de cáncer hemático.

Se describen otras ventajas en el presente estudio.

La presente invención proporciona, entre otros, una célula T modificada con inactivación de receptor (TCR KO) dotada de un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico para CD22 (CART22), un interruptor de seguridad, preferentemente expresado en la superficie celular, comprendiendo dicho CAR anti-CD22 (CAR CD22):

i) por lo menos un dominio extracelular que comprende:

- un dominio bisagra de CD8alfa,
- un dominio de unión a antígeno específico para CD22, opcionalmente una secuencia líder,

ii) un dominio transmembranal de CD8alfa, y  
iii) un dominio de señalización intracelular,

presentando dicho CAR CD22 una secuencia polipeptídica con una identidad de por lo menos 80 % respecto a la secuencia SEC ID n.º 15,

comprendiendo dicho interruptor de seguridad:

- un RQR8 temporalmente unido al CAR CD22 por el péptido 2A, o
- por lo menos dos epítopos específicos del mAb rituximab, preferentemente situados entre el VH y el dominio bisagra, o 3 epítopos específicos del mAb rituximab o 3 epítopos específicos del mAb rituximab y un epítipo específico de mAb QBEN-10 unido al CAR de CD22.

La presente invención se expone adicionalmente en el juego de reivindicaciones adjunto.

#### *Realizaciones de un CAR de CD22*

La invención utiliza un CAR anti-CD22 que comprende un dominio bisagra de CD8 alfa.

El CAR anti-CD22 según lo anterior, en el que un scfv específico para CD22 que comprende un VH y un VL unidos entre sí mediante el conector L1, preferentemente un conector que comprende 1 a 3 motivos «GGGS», más preferentemente un motivo «GGGS».

El CAR anti-CD22 según cualquiera de lo anterior, en el que dicho scfv específico para CD22 está unido a un dominio transmembranal de CD8alfa mediante una bisagra de CD8 alfa.

5 El CAR anti-CD22 según cualquiera de lo anterior que comprende un dominio intracelular, comprendiendo dicho dominio intracelular un dominio de señalización CD3zeta y un dominio de señalización 4-1BB.

10 El CAR anti-CD22 tal como cualquiera de lo anterior, en el que el CAR anti-CD22 comprende por lo menos dos epítomos específicos del mAb rituximab, preferentemente situados entre el VH y el dominio bisagra, o 3 epítomos específicos del mAb rituximab o 3 epítomos específicos del mAb rituximab y un epítomo específico de mAb QBEN-10 unido al CAR de CD22.

15 El CAR anti-CD22 tal como cualquiera de lo anterior, en el que el epítomo específico de mAb es un polipéptido seleccionado de ELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTA y CPYSNPSTLC (SEC ID n.º 19).

Se da a conocer un polinucleótido codificante de un CAR anti-CD22 según cualquiera de lo anterior o un polinucleótido que presenta una identidad de por lo menos 80 % respecto a dicho polinucleótido codificante de un CAR anti-CD22, un vector que comprende un polinucleótido según cualquiera de los polinucleótidos anteriormente indicados.

20 Tal como se da a conocer posteriormente en el presente documento, pueden editarse otros genes en dicho UCART22, en particular el gen de dCK, el gen de B2M o el gen de CD52.

#### *UCART proporcionados*

25 Se proporciona el UCART22 tal como se ha descrito anteriormente, en el que por lo menos un gen adicional ha sido editado o modificado; dicho gen se selecciona de un gen codificante de receptor de hidrocarburo arilo (AHR, por sus siglas en inglés), receptor de factor de crecimiento transformante beta (receptor de TGF-beta), receptor de interleuquina-10 (IL-10R), proteína 1 de muerte celular programada o una combinación de los mismos.

30 El UCART22 tal como se ha descrito anteriormente en el que por lo menos un gen adicional comprende una mutación, una delección o una inserción que inactiva la actividad y/o expresión de dicho gen seleccionado de un gen codificante de receptor de hidrocarburo arilo (AHR), de receptor de factor de crecimiento transformante beta (receptor de TGF-beta), de receptor de interleuquina-10 (IL-10R), de proteína 1 de muerte celular programada o una combinación de los mismos.

35 El UCART22 tal como se ha descrito anteriormente en el que por lo menos un gen adicional comprende una mutación, una delección o una inserción que inactiva la actividad y/o expresión de dicho gen, seleccionado de un gen codificante de receptor de hidrocarburo arilo (AHR), de receptor de factor de crecimiento transformante beta (receptor de TGF-beta), de receptor de interleuquina-10 (IL-10R), de proteína 1 de muerte celular programada o una combinación de los mismos.

40 El UCART22 tal como se ha descrito anteriormente en el que por lo menos un gen adicional comprende una mutación, una delección o una inserción que inactiva la actividad y/o expresión de dicho gen seleccionado de un gen codificante de receptor de factor de crecimiento transformante beta (receptor de TGF-beta), de receptor de interleuquina-10 (IL-10R), de proteína 1 de muerte celular programada o una combinación de los mismos.

45 El UCART22 tal como se ha descrito anteriormente en el que por lo menos un gen adicional comprende una mutación, una delección o una inserción que inactiva la actividad y/o expresión de dicho gen seleccionado de un gen codificante de receptor de hidrocarburo arilo (AHR), de receptor de interleuquina-10 (IL-10R), de proteína 1 de muerte celular programada o una combinación de los mismos.

50 El UCART22 tal como se ha descrito anteriormente en el que por lo menos un gen adicional comprende una mutación, una delección o una inserción que inactiva la actividad y/o expresión de dicho gen seleccionado de un gen codificante de receptor de hidrocarburo arilo (AHR), de receptor de factor de crecimiento transformante beta (receptor de TGF-beta), de proteína 1 de muerte celular programada o una combinación de los mismos.

Los genes en los que puede insertarse dicho CAR se enumeran a continuación, en la Tabla 9.

Tabla 9: lista de genes codificantes de proteínas de punto de control inmunitario que pueden inactivarse según la presente invención en las células T modificadas CAR CD22 de la invención.

Ruta		Genes que pueden ser inactivados en la ruta
Receptores coinhibidores	CTLA4 (CD152)	CTLA4, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22
	PDCD1 (PD-1, CD279)	PDCD1
	CD223 (lag3)	LAG3
	HAVCR2 (tim3)	HAVCR2
	BTLA(cd272)	BTLA
	CD160(by55)	CD160
	Familia de IgSF	TIGIT
		CD96
		CRTAM
	LAIR1(cd305)	LAIR1
	SIGLECs	SIGLEC7
		SIGLEC9
Receptores de muerte	CD244(2b4)	CD244
	TRAIL	TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7
Señalización de citoquinas	FAS	FADD, FAS
	Señalización de TGF-beta	TGFBRII, TGFBRI, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKI1, TGIF1
	Señalización de IL10	IL10RA, IL10RB, HMOX2
Bloqueo de la señalización de TCR	Señalización de IL6	IL6R, IL6ST
		CSK, PAG1
T <sub>reg</sub> inducidas		SIT1
	T <sub>reg</sub> inducidas	FOXP3
Factores de transcripción que controlan el agotamiento	Factores de transcripción que controlan el agotamiento	PRDM1 (=blimp1, los ratones heterocigóticos controlan la infección vírica crónica mejor que los wt o los KO condicionales)
		BATF
Tolerancia mediada por hipoxia	Guanilato ciclasa inducida por iNOS	GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, GUCY1B3

5 En negrita se muestran los genes preferentes inactivados en el UCART de la invención.

El UCART22 tal como anteriormente que comprende un CAR anti-CD22 (UCART22) según cualquiera de lo anterior, en el que se inserta un polinucleótido codificante de dicho CAR anti-CD22 (UCART22 en el genoma en el gen de CD25.

10 El UCART22 según cualquiera de lo anterior, en el que el CAR anti-CD22 es un CAR de cadena sencilla.

El UCART22 según cualquiera de lo anterior, en el que el CAR anti-CD22 es un CAR de cadena sencilla que comprende un scfv adicional específico para cualquiera de los antígenos de superficie asociados a tumor siguientes seleccionados de entre CD19, CD20, CD30, una molécula de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), una inmunoglobulina (Ig), CD3, CD5, CD34, CD79, preferentemente CD79b, CD138, B7-1 (CD80), BCMA (CD269, TNFRSF 17), FLT-3, o PAX5, preferentemente CD19.

20 El UCART22 según cualquiera de lo anterior, en el que el CAR anti-CD22 es un CAR de cadena sencilla que comprende un scfv adicional específico para CD19.

El UCART22 según cualquiera de lo anterior que expresa un CAR anti-CD22 y un CAR anti-CD19, preferentemente de SEC ID n.º 94 o de SEC ID n.º 95.

25 El UCART22 según cualquiera de lo anterior, en el que el CAR anti-CD22 es un CAR de cadena sencilla que comprende un scfv adicional específico para CD20.

El UCART22 según cualquiera de lo anterior, en el que el CAR anti-CD22 es un CAR de cadena sencilla que comprende un scfv adicional específico para CD30.

30 El UCART22 según cualquiera de lo anterior, en el que el CAR anti-CD22 es un CAR de cadena sencilla que comprende un scfv adicional específico para la molécula de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).

35 El UCART22 según cualquiera de lo anterior, en el que el CAR anti-CD22 es un CAR de cadena sencilla que comprende un scfv adicional específico para una inmunoglobulina (Ig).

El UCART22 según cualquiera de lo anterior, en el que el CAR anti-CD22 es un CAR de cadena sencilla que comprende un scfv adicional específico para CD3.

El UCART22 según cualquiera de lo anterior, en el que el CAR anti-CD22 es un CAR de cadena sencilla que comprende un scfv adicional específico para CD5.

El UCART22 según cualquiera de lo anterior, en el que el CAR anti-CD22 es un CAR de cadena sencilla que comprende un scfv adicional específico para CD34.

El UCART22 según cualquiera de lo anterior, en el que el CAR anti-CD22 es un CAR de cadena sencilla que comprende un scfv adicional específico para CD79, preferentemente CD79b.

El UCART22 según cualquiera de lo anterior, en el que el CAR anti-CD22 es un CAR de cadena sencilla que comprende un scfv adicional específico para CD138.

El UCART22 según cualquiera de lo anterior, en el que el CAR anti-CD22 es un CAR de cadena sencilla que comprende un scfv adicional específico para CD80.

El UCART22 según cualquiera de lo anterior, en el que el CAR anti-CD22 es un CAR de cadena sencilla que comprende un scfv adicional específico para BCMA (CD269).

El UCART22 según cualquiera de lo anterior, en el que el CAR anti-CD22 es un CAR de cadena sencilla que comprende un scfv adicional específico para TNFRSF17.

El UCART22 según cualquiera de lo anterior, en el que el CAR anti-CD22 es un CAR de cadena sencilla que comprende un scfv adicional específico para FLT-3.

Una población de células que comprende el UCART22 según cualquiera de los anteriores.

Una población de células que comprende el UCART22 según cualquiera de los anteriores y en el que las células que expresan dicho CAR anti-CD22 también expresan un CAR anti-CD19, preferentemente dicho CAR anti-CD19 comprende una secuencia SEC ID n.º 25 o SEC ID n.º 26 en la superficie celular.

Una célula T CAR CD22 (UCART22), opcionalmente combinada con un inhibidor de proteína quinasa C, tal como briostatina-1, como composición farmacéutica de la invención, resulta particularmente útil para el tratamiento de LLC, LLA, mieloma múltiple (MM), neoplasma de células dendríticas plasmacitoides blásticas (NCDPB), especialmente LLA refractario/recaído, LLC refractario/recaído y/o formas agresivas de dichas enfermedades, más preferentemente LLA-B refractario o en recaída.

Una célula T CAR CD22 (UCART22), derivada de m971, opcionalmente combinada con un inhibidor de proteína quinasa C, tal como briostatina-1, como composición farmacéutica de la invención, resulta particularmente útil para el tratamiento de LLC, LLA, mieloma múltiple (MM), neoplasma de células dendríticas plasmacitoides blásticas (NCDPB), especialmente LLA refractario/recaído, LLC refractario/recaído y/o formas agresivas de dichas enfermedades, más preferentemente LLA-B refractario o en recaída.

Las células inmunitarias modificadas de la presente invención no solo muestran un nivel elevado de actividad *in vivo* contra las células malignas y menor liberación de citoquinas, sino que su número y actividad están controlados, confiriendo seguridad y eficiencia a la inmunoterapia.

La presente invención proporciona una célula T humana modificada con inactivación de receptores (TCR KO) dotada de un receptor de antígeno quimérico específico para CD22 (CAR CD22) (UCART22), un interruptor de seguridad, preferentemente expresado en la superficie celular, en el que dicho CAR CD22 comprende:

i) por lo menos un dominio extracelular que comprende:

- un dominio bisagra de CD8alfa,
- un dominio de unión a antígeno específico para CD22, opcionalmente una secuencia líder,

ii) un dominio transmembranal de CD8alfa, y  
iii) un dominio de señalización intracelular,

presentando dicho CAR CD22 una secuencia polipeptídica con una identidad de por lo menos 80 % respecto a la secuencia SEC ID n.º 15, comprendiendo dicho interruptor de seguridad:

- un RQR8 temporalmente unido al CAR CD22 por el péptido 2A, o

- por lo menos dos epítomos específicos del mAb rituximab, preferentemente situados entre el VH y el dominio bisagra, o 3 epítomos específicos del mAb rituximab o 3 epítomos específicos del mAb rituximab y un epítomo específico de mAb QBEN-10 unido al CAR de CD22, y

comprendiendo dicho UCART22 por lo menos un gen editado adicional, preferentemente una delección en el gen CD52.

El UCART de CD22 según lo anterior comprende las secuencias siguientes:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAV  
SVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMTVTVSS y  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGS  
GTDFTLTISLQAEDFATYYCQSQSYIPQTFGQGTGLEIK o presenta una homología de 80 % a 99 % con cada una de dichas secuencias.

La presente invención proporciona, además, un UCART22 tal como anteriormente que comprende un polipéptido de SEC ID n.º 15 y un interruptor de seguridad que comprende:

- un RQR8 temporalmente unido al CAR CD22 por el péptido 2A, o
- por lo menos dos epítomos específicos del mAb rituximab, preferentemente 3 epítomos específicos del mAb rituximab o más preferentemente 3 epítomos específicos del mAb rituximab y un epítomo específico de mAb QBEN-10 unido al CAR de CD22.

[permitiendo la separación y/o agotamiento de las células inmunitarias dotadas de dicho CAR de CD22].

La presente invención proporciona, además, un UCART22 tal como anteriormente que comprende por lo menos un gen editado adicional, preferentemente una delección en el gen CD52, o en un gen dCK o una delección en un gen de microglobulina beta2 o en el gen CTIIA, todavía más preferentemente una delección en el gen CD52, y/o una inserción en el gen HIF-1alfa, que confiere resistencia a la hipoxia.

La presente invención proporciona un UCART22 tal como anteriormente que comprende una delección en el gen CD52, en combinación con alemtuzumab.

La presente invención proporciona, además, un UCART22 tal como anteriormente, en el que dicho CAR de CD22 se expresa bajo hipoxia (baja concentración de O<sub>2</sub> que es inferior a 5 % de O<sub>2</sub>, preferentemente inferior a 1 % de O<sub>2</sub>).

En una realización preferente, la presente invención proporciona un UCART22 tal como anteriormente que comprende un polinucleótido de SEC ID n.º 22 y de SEC ID n.º 18 en el mismo gen, preferentemente en el gen de TRAC.

En una realización preferente, la presente invención proporciona un UCART22 tal como anteriormente que comprende un polinucleótido de SEC ID n.º 20 y de SEC ID n.º 18 en el mismo gen, preferentemente en el gen de TRAC.

La presente invención proporciona una población de células que comprende un UCART22 tal como anteriormente.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el UCART22 tal como anteriormente o una población de células que comprende dicho UCART22 tal como cualquiera de los anteriores y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En realizaciones particulares, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el UCART22 según la invención o una población de células que comprende dicho UCART22 en combinación con un UCART CD19 y un excipiente farmacéuticamente aceptable. UCART19 y UCART22 pueden administrarse simultáneamente, concomitantemente o sucesivamente empezando con UCART19, o con UCART22, según el nivel de expresión de CD19 y CD22 en las células de cáncer del paciente.

En realizaciones particulares, se proporciona una composición farmacéutica que comprende UCART22/19 o UCART19/22 (CAR de cadena sencilla biespecífico o células que expresan tanto CAR CD19 como CAR CD22) y un excipiente farmacéuticamente aceptable. La presente invención proporciona una composición farmacéutica tal como anteriormente, que comprende, además, un compuesto de la familia de briostatina, preferentemente briostatina-1.

La presente invención proporciona la composición farmacéutica que comprende dicho UCART22 tal como anteriormente para la utilización como un medicamento para el tratamiento de pacientes.

La presente invención proporciona la composición farmacéutica tal como anteriormente para la utilización como un medicamento para el tratamiento de pacientes, en donde el tratamiento de pacientes comprende administrar por lo menos dos veces (readministración) dicha cantidad terapéuticamente eficaz de UCART CD22 o dicha composición farmacéutica para evitar una recaída.

En una realización particular, la presente invención proporciona la composición farmacéutica según cualquiera de lo anterior para la utilización como un medicamento para el tratamiento de pacientes, en donde el tratamiento de pacientes comprende administrar un UCART22 tal como anteriormente o una composición farmacéutica tal como anteriormente por lo menos dos veces para evitar las recaídas.

La presente invención proporciona la composición farmacéutica tal como anteriormente para la utilización como un medicamento para el tratamiento de pacientes tal como anteriormente, para el tratamiento de una patología relacionada con CD22, preferentemente una neoplasia maligna de células B relacionada con CD22 (p. ej., un cáncer hemático relacionado con CD22).

En una realización particular, la presente invención proporciona:

La composición farmacéutica tal como anteriormente para la utilización como un medicamento para el tratamiento de un cáncer hemático, tal como un cáncer hemático seleccionado de linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, leucemia, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica tipo B, leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de Burkitt, cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, preferentemente un cáncer hemático expresante de CD22, más preferentemente un cáncer hemático expresante de CD22 recaído-refractario, todavía más preferentemente una forma agresiva de dicho cáncer hemático relacionado con CD22.

Preferentemente, el UCART22 se utiliza para el tratamiento de pacientes con LLA-B recaído-refractario.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica tal como anteriormente para la utilización como un medicamento para el tratamiento de un paciente en el que dicho paciente sufre de un cáncer seleccionado de rhabdomyosarcoma alveolar, cáncer de vejiga (p. ej., carcinoma de vejiga), cáncer óseo, cáncer cerebral (p. ej., meduloblastoma), cáncer de mama, cáncer del ano, canal anal o anorrecto, cáncer ocular, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de las articulaciones, cáncer del cuello, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de la pleura, cáncer de nariz, cáncer de la cavidad nasal, cáncer del oído medio, cáncer de la cavidad oral, cáncer de vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer esofágico, cáncer cervical, fibrosarcoma, tumor carcinoide gastrointestinal, cáncer de cabeza y cuello (p. ej., carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), cáncer de hipofaringe, cáncer renal, cáncer de laringe, cáncer hepático, cáncer pulmonar (p. ej., carcinoma pulmonar no microcítico), mesotelioma maligno, mastocitoma, melanoma, cáncer nasofaríngeo, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de peritoneo, cáncer de omento, cáncer mesentérico, cáncer de faringe, cáncer prostático, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer del intestino delgado, cáncer de tejidos blandos, tumores sólidos, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides y cáncer de uréter.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1: representación esquemática de una célula inmunitaria modificada según la invención. La célula inmunitaria modificada que se presenta en la figura 1 puede ser una célula T dotada de un polinucleótido codificante de un CAR de la invención. Esta célula T se modifica adicionalmente para permitir una injertación mejor y más segura en el paciente. X o Y es un gen editado que puede ser mutado, deleciónado y/o presentar una inserción. Por ejemplo, un gen que expresa un componente del receptor de células T (TCR), por ejemplo TCR-alfa o TCR-beta, puede delecionarse o puede comprender una inserción; Y puede ser un gen que participa en la sensibilidad de las células T a los fármacos inmunosupresores como dCK (con respecto a la resistencia a análogos de nucleótido purina) o CD52 (con respecto a Campath) o HPRT (con respecto a la 6-tioguanina).

Figura 2: representación de un CAR CD22 de cadena sencilla y uno multicadena. La figura 2 ilustra ejemplos de CAR CD22 que comprenden un scfv específico para CD22, que opcionalmente comprende un interruptor de seguridad, una bisagra y un dominio transmembranal de CD8-alfa, dominios intracelulares de 4-1BB y CD3-zeta, y opcionalmente un dominio que confiere resistencia a la hipoxia.

Figura 3: ejemplos de constructos de CAR CD22 de la invención que comprenden un interruptor de seguridad. Por lo menos un epítipo específico de mAb rituximab (R) (caja negra), preferentemente 3 epítipos específicos de mAb rituximab y más preferentemente 3 epítipos específicos de mAb rituximab y un epítipo específico de mAb QBEN-10 (Q) (caja gris) se insertan en el CAR CD22. R puede insertarse en el scfv, entre un dominio VH y un dominio VL (o entre un dominio VL y un dominio VH) y/o en la bisagra.

Figura 4: ejemplo de un polipéptido codificado por un polinucleótido. La figura 4 representa un ejemplo de polipéptido que se escindirán de manera que se expresará en la superficie celular un interruptor de seguridad (RQR8) y un CAR CD22.

R=mimotopo de CD20 (se une al rituximab), Q=epítipo de CD34 (se une a QBEnd10)

Figura 5: actividad de degranulación de UCART22. Actividad de degranulación de UCART22 (scfv-V1 contra el dominio proximal de CD22) en comparación con la actividad de degranulación de células T no transducidas (NT) o células T transducidas con un CAR con diana en la parte distal de CD22 (scfv-V2), en presencia de células NALM-16 positivas para CD22 en comparación con células SUP-T1 negativas para CD22.



Figura 6: actividad citotóxica de UCART22. Actividad citotóxica de UCART22 (scfv-V1 contra el dominio proximal de CD22) en comparación con la actividad citotóxica de células T no transducidas (NT) o células T transducidas con un CAR con diana en la parte distal de CD22 (scfv-V2), en presencia de células NALM-16 positivas para CD22 en comparación con células SUP-T1 negativas para CD22.

Figura 7: producción de interferón-gamma de UCART22.

Figura 8: supervivencia de ratones en la presencia de células de control, UCART22 (scfv-V1 contra el dominio proximal de CD22) o CART22 (sin delección de TRAC).

Figura 9: estrategia general para insertar un gen en el gen TRAC utilizando TALEN.

#### Descripción detallada de la invención

A menos que se define específicamente en la presente memoria, todos los términos técnicos y científicos utilizados presentan el mismo significado al entendido comúnmente por el experto en los campos de la terapia génica, la bioquímica, la genética, la inmunología y la biología molecular.

La práctica de la presente invención utiliza, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, las cuales se encuentran comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la materia. Tales técnicas se explican por completo en la literatura. Ver, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición (Sambrook et al, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. La patente US n.º 4.683.195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries y S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames y S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the series, Methods In ENZYMOLOGY (J. Abelson y M. Simon, eds. en jefe, Academic Press, Inc., New York), específicamente, vols.154 y 155 (Wu et al. eds.) y vol. 185, "Gene Expression Technology" (D. Goeddel, ed.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986) y Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

#### *Receptores de antígeno quiméricos específicos de CD22*

La presente invención se basa en nuevos diseños de receptor de antígeno quimérico anti-CD22 (CAR o CAR CD22 o CAR anti-CD22), que son receptores de antígeno quiméricos capaces de unirse a CD22, en particular al dominio proximal de CD22.

Los receptores de antígeno quiméricos específicos de CD22 comprenden un dominio extracelular que comprende un dominio de unión a ligando extracelular y una bisagra, opcionalmente un dominio de suicidio, un dominio transmembranal y un dominio intracelular que comprende un dominio de transducción de señalización.

El CAR CD22 se expresa en la superficie celular y comprende un dominio extracelular que comprende un dominio de unión a ligando extracelular.

La expresión «dominio de unión a ligando extracelular» tal como se utiliza en la presente memoria se define como un oligopéptido o polipéptido que es capaz de unirse a por lo menos un epítipo de CD22. Preferentemente, el dominio de unión a ligando extracelular será capaz de interactuar por lo menos parcialmente con una molécula de superficie celular que interactúa con CD22 y con otro antígeno de superficie celular u otro antígeno de unión a membrana, o que interactúa directamente con CD22, o que interactúa con CD22 humano, más precisamente que interactúa directamente con la región proximal de CD22 humano (entre el aminoácido 243 y el aminoácido 687).

En una realización, un CAR CD22 comprende un dominio extracelular que comprende un dominio de unión a ligando extracelular capaz de interactuar con la región proximal de CD22 (entre el aminoácido 243 y el aminoácido 687).

En el presente documento, el dominio extracelular de longitud completa de CD22 está comprendido entre el aminoácido (aa) 20 y el aa 687; el dominio proximal a membrana de CD22 está comprendido entre aa 243 y aa 687 y el dominio distal a membrana de CD22 está comprendido entre aa 20 y aa 425.

En una realización, el dominio de unión a ligando extracelular puede seleccionarse para reconocer una forma particular (glucosilada) de CD22 que actúa como marcador de superficie celular sobre células diana asociadas a un estado de enfermedad particular.

En una realización preferente, dicho dominio de unión a ligando extracelular comprende por lo menos un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla (scFv) que comprende el fragmento variable ligero ( $V_L$ ) y el pesado ( $V_H$ ) de un anticuerpo anti-CD22 específico de antígeno diana, unido mediante un conector, en particular un conector flexible. Dichos  $V_L$  y  $V_H$  son del anticuerpo m971, tal como en la Tabla 2, posteriormente. Se unen entre sí preferentemente mediante un conector flexible que comprende, por ejemplo, la secuencia SEC ID n.º 10.

Para el propósito de la presente invención, partes específicas del anticuerpo anti-CD22 totalmente humano, el anticuerpo m971 (m971) previamente identificado utilizando metodología de exposición fágica y caracterizado (Xiao X, Ho M, Zhu Z, Pastan I, Dimitrov DS. Identification and characterization of fully human anti-CD22 monoclonal antibodies. mAbs. 2009;1(3):297-303) se combinaron en secuencias específicas para producir nuevos CAR CD22, según la invención. Ver también el documento n.º WO 2014065961.

Una realización preferente de la invención proporciona CAR que comprenden un dominio de unión a antígeno que comprende, consiste, o consiste esencialmente, en un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) del dominio de unión a antígeno de m971 con las fracciones siguientes, tal como en la Tabla 1.

Tabla 1: secuencia de dominios diferentes en CAR CD22

Dominios funcionales	SEC ID n.º	Secuencia de aminoácidos sin procesar
Péptido de señal CD8 $\alpha$ (o secuencia líder)	SEC ID n.º 1	MALPVTALLPLALLLHAARP
Péptido de señal alternativo	SEC ID n.º 2	METDTLLLWVLLWVPGSTG
Bisagra de Fc $\gamma$ RIIIa	SEC ID n.º 3	GLAVSTISSFFPPGYQ
Bisagra de CD8 $\alpha$	SEC ID n.º 4	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACD
Bisagra de IgG1	SEC ID n.º 5	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIA RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNK
		ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
Dominio transmembranal de CD8 $\alpha$	SEC ID n.º 6	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
Dominio transmembranal de 41BB	SEC ID n.º 7	IISFFLALTSTALLFLFLLTLRFSVV
Dominio intracelular de 41BB	SEC ID n.º 8	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCEL
dominio intracelular de CD3 $\zeta$	SEC ID n.º 9	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLD KRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
Conector	SEC ID n.º 10	GGGGSGGGGSG GGGS

Tabla 2: secuencias de diferentes VH y VL de scfv de CD22

Secuencias de scfv	SEC ID n.º	secuencia de aminoácidos sin procesar
m971 - región variable de cadena pesada	SEC ID n.º 12	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIR QSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKN QFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGGQGT MTVTVSS
m971 - región variable de cadena ligera	SEC ID n.º 13	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLNWYQQR PKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGSGTDFTLTISSLQAED FATYYCQQSYIPQTFGQGTKEIK

Tabla 3: CAR CD22 de estructura V-1

Designación de CAR	Estructura de CAR						
V-1	Péptido de señal	VH	VL	Bisagra de FcγRIIIα	TM CD8α	41BB -IC	CD CD3ζ
m971 (SEC ID n.º 14)	SEC ID n.º 1	SEC ID n.º 12	SEC ID n.º 13	SEC ID n.º 3	SEC ID n.º 6	SEC ID n.º 8	SEC ID n.º 9

Tabla 4: CAR de estructura V-3

Designación de CAR	Estructura de CAR						
V-3	Péptido de señal	VH	VL	bisagra de CD8α	TM CD8α	41BB -IC	CD CD3ζ
m971 (SEC ID n.º 15)	SEC ID n.º 1	SEC ID n.º 12	SEC ID n.º 13	SEQ ID n.º 4	SEC ID n.º 6	SEC ID n.º 8	SEC ID n.º 9

En una realización preferente, el CAR CD22 utilizado de acuerdo con la invención comprende la secuencia SEC ID n.º 15.

Las secuencias de los CAR CD22 de la invención comprenden un péptido de señal, un dominio TM de CD8-alfa y un conector entre los dominios VH y VL de m971.

#### SCFV

En la presente invención, un scfv es una proteína de fusión de la región variable de la cadena pesada ( $V_{\text{dominio H}}$ ) y de la cadena ligera ( $V_{\text{dominio L}}$ ) de una inmunoglobulina o una parte de una inmunoglobulina específica para CD22, conectada a un péptido conector corto de 10 a 25 aminoácidos, preferentemente de SEC ID n.º 10.

En una realización preferente, dichos CAR preferentemente comprenden un dominio de unión a ligando extracelular que comprende una secuencia polipeptídica que muestra una identidad de por lo menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 12.

En una realización preferente, dichos CAR preferentemente comprenden un dominio de unión a ligando extracelular que comprende una secuencia polipeptídica que muestra una identidad de por lo menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 13.

En una realización preferente, dichos CAR preferentemente comprenden un dominio de unión a ligando extracelular que comprende una secuencia polipeptídica que muestra una identidad de por lo menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 12 y una secuencia polipeptídica que muestra una identidad de por lo menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 13.

#### BISAGRA

El dominio extracelular comprende, además, una región de bisagra de CD8-alfa entre dicho dominio de unión a ligando extracelular y dicho dominio transmembranal. La expresión «región de bisagra» utilizada en la presente memoria se refiere de manera general a cualquier oligopéptido o polipéptido que funcionan uniendo el dominio transmembranal al

dominio de unión a ligando extracelular. En particular, se utiliza la región bisagra para proporcionar más flexibilidad y accesibilidad para el dominio de unión a ligando extracelular. Una región de bisagra puede comprender preferentemente 10 a 50 aminoácidos. En una realización preferente, dicho dominio de bisagra comprende una parte de una cadena CD8-alfa humana denominada en la presente especificación SEC ID n.º 4, o en una realización más preferente, un polipéptido bisagra que muestra una identidad de secuencia de por lo menos 80 %, preferentemente de por lo menos 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % respecto a la SEC ID n.º 4, todavía más preferentemente una identidad de secuencia de 100 % respecto a la SEC ID n.º 4.

Un CAR CD22 según la presente invención se ancla en la membrana celular. De esta manera, dicho CAR CD22 comprende, además, un dominio transmembranal. Las características distintivas de los dominios transmembranales apropiados comprenden la capacidad de expresarse en la superficie de una célula, preferentemente en la presente invención una célula inmunitaria, en particular células de linfocitos o células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), y la capacidad de interactuar entre sí para dirigir la respuesta celular de la célula inmunitaria contra una célula diana predefinida. El dominio transmembranal se deriva de la cadena CD8-alfa humana (p. ej., NP\_001139345.1).

Un CAR CD22 utilizado según la invención generalmente comprende, además, un dominio transmembranal (TM), más particularmente de CD8 $\alpha$ , que muestra identidad con los polipéptidos de SEC ID n.º 6 o SEC ID n.º 7. Preferentemente, un CAR según la invención comprende un TM que muestra una identidad de secuencia de por lo menos 70 %, preferentemente por lo menos 80 %, más preferentemente por lo menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % respecto a los polipéptidos de SEC ID n.º 6.

Un CAR CD22 utilizado según la invención generalmente comprende, además, un dominio transmembranal (TM) de CD8 $\alpha$  que muestra identidad con los polipéptidos de SEC ID n.º 6. Preferentemente, un CAR según la invención comprende un TM que muestra una identidad de secuencia de por lo menos 70 %, preferentemente por lo menos 80 %, más preferentemente por lo menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % respecto a los polipéptidos de SEC ID n.º 6.

Un CAR CD22 utilizado según la presente invención comprende un dominio intracelular que comprende un dominio de transducción de señal o dominio de señalización intracelular.

El dominio de transducción de señal o dominio de señalización intracelular de un CAR CD22 según la presente invención es responsable de la señalización intracelular tras la unión de un dominio de unión a ligando extracelular a la diana, resultando en la activación de la célula inmunitaria y la respuesta inmunitaria (actividad citolítica contra la célula diana). En otras palabras, el dominio transductor de señal es responsable de la activación de por lo menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la que se expresa el CAR. Por ejemplo, la función efectora de una célula T puede ser una actividad citolítica o actividad de ayudante, incluyendo la secreción de citoquinas. De esta manera, la expresión «dominio de transducción de señal» se refiere a la parte de una proteína que transduce la señal efectora de función y dirige la célula a realizar una función especializada.

Pueden ser ejemplos preferentes de dominio de transducción de señal en un CAR CD22 utilizado según la invención, las secuencias citoplasmáticas del receptor y correceptores de células T que actúan en concierto para iniciar la transducción de señales tras el acoplamiento del receptor de antígeno, así como cualquier derivado o variante de dichas secuencias y cualquier secuencia sintética que presente la misma capacidad funcional. El dominio de transducción de señales comprende dos clases claras de secuencia de señalización citoplasmática, aquellas secuencias que inician la activación primaria dependiente de antígeno y aquellas que actúan de una manera independiente de antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora. La secuencia primaria de señalización citoplasmática puede comprender motivos de señalización que son conocidos como motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosinas (ITAM, por sus siglas en inglés). Los ITAM son motivos de señalización bien definidos que se encuentran en la cola intracitoplasmática de una variedad de receptores que sirven como sitios de unión para las tirosina quinasas de clase syk/zap70. Entre los ejemplos de ITAM pueden incluirse a modo de ejemplos no limitativos, aquellos derivados de TCRzeta, FcRgamma, FcRbeta, FcRepsilon, CD3gamma, CD3delta, CD3epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En una realización preferente, el dominio de transducción de señalización del CAR puede comprender el dominio de señalización de CD3zeta que presenta una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencias de por lo menos 70 %, preferentemente de por lo menos 80 %, más preferentemente de por lo menos 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID n.º 9. Opcionalmente, dicho dominio de señalización de CD3-zeta comprende una secuencia polipeptídica que muestra una identidad de por lo menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100% respecto a SEC ID n.º 9.

En una realización más preferente, el dominio de transducción de señales del CAR CD22 consiste en un dominio de señalización de CD3zeta de SEC ID n.º 9 y excluye cualquier secuencia del dominio de señalización CD28 humano. En una realización particular, el dominio de transducción de señales del CAR utilizado según la presente invención comprende una molécula de señal coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de superficie celular diferente de un receptor de antígeno o sus ligandos que resulta necesaria para una respuesta inmunitaria eficiente. La expresión «ligando coestimulador» se refiere a una molécula en una célula presentadora de antígeno que se une específicamente a una molécula coestimuladora afín sobre una célula T, proporcionando de esta manera una señal

que, además de la señal primaria proporcionada mediante, por ejemplo, la unión de un complejo TCR/CD3 con una molécula del CHM cargada con péptido, actúa de mediador en una respuesta de células T, incluyendo, aunque sin limitación, la activación de la proliferación, la diferenciación y similares. Un ligando coestimulador puede incluir, aunque sin limitación, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulador inducible (ICOS-L, por sus siglas en inglés), molécula de adhesión intercelular (ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, receptor de linfotóxina-beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, un agonista o anticuerpo que se une al receptor de ligando de tipo Toll y un ligando que se une específicamente a B7-H3. Un ligando coestimulador también comprende, entre otros, un anticuerpo que se une específicamente a una molécula coestimuladora presente sobre una célula T, tal como, aunque sin limitación, CD27, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1, por sus siglas en inglés), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente a CD83.

La expresión «molécula coestimuladora» se refiere a la pareja de unión afín sobre una célula T que se une específicamente a un ligando coestimulador, mediando de esta manera en una respuesta coestimuladora por la célula, tal como, aunque sin limitación, la proliferación. Entre las moléculas coestimuladoras se incluyen, aunque sin limitación, una molécula del CHM de clase I, BLTA y un receptor de ligando de tipo Toll. Entre los ejemplos de moléculas coestimuladoras se incluyen CD27, CD8, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1, por sus siglas en inglés), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente a CD83 y similares.

En una realización preferente, el dominio de transducción de señales del CAR de la presente invención comprende una parte de una molécula de señal coestimuladora que consiste en un fragmento de 4-1BB (GenBank: AAA53133.) En particular, el dominio de transducción de señales del CAR de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una identidad de secuencias de por lo menos 70 %, preferentemente de por lo menos 80 %, más preferentemente de por lo menos 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID n.º 8.

En una realización más preferente, el dominio de transducción de señales del CAR de la presente invención no comprende ninguna secuencia de CD28 (NP\_006130.1).

En una realización todavía más preferente, ninguna de las realizaciones de la presente invención comprende ninguna secuencia de CD28 (NP\_006130.1).

En una realización todavía más preferente, el dominio de transducción de señales del CAR CD22 de la presente invención comprende una parte de la molécula de señal coestimuladora 4-1BB (GenBank: AAA53133) y ninguna secuencia de CD28 (NP\_006130.1).

La presente invención utiliza un receptor de antígeno quimérico específico de CD22 (CAR CD22) que comprende:

un dominio extracelular que comprende:

- un dominio de unión específico para CD22, preferentemente un dominio de unión específico para CD22 humano, más preferentemente dicho dominio de unión específico para CD22 humano es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv, por sus siglas en inglés),
- una bisagra de CD8-alfa,
- un dominio transmembranal de CD8alfa,
- un dominio intracelular que comprende:
- una molécula de señal coestimuladora de 4-1BB humano, y

un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización de CD3-zeta humano.

En una realización preferente, el CAR CD22 utilizado según la invención no presenta ninguna secuencia de CD28.

En una realización preferente, el CAR CD22 utilizado según la invención no contiene ninguna secuencia de CD28 y comprende un líder de secuencia, un dominio TM y una bisagra de CD8 $\alpha$ , preferentemente ninguna secuencia de CD28 y comprende una secuencia líder de SEC ID n.º 1, un dominio TM de SEC ID n.º 6 y una bisagra de SEC ID n.º 4 de CD8 $\alpha$ .

En una realización, el CAR CD22 utilizado según la invención comprende una secuencia líder de CD8 $\alpha$  humano (SEC ID n.º 1) o una secuencia líder que presenta una identidad de por lo menos 95 % respecto a la SEC ID n.º 1.

En otra realización, el CAR CD22 utilizado según la invención comprende una secuencia líder de SEC ID n.º 2 o una secuencia líder que presenta una identidad de por lo menos 95 % respecto a la SEC ID n.º 2.

En una realización, la presente invención utiliza un receptor de antígeno quimérico específico de CD22 (CAR CD22) que comprende:

- un dominio de unión específico para CD22 que comprende un VH y un VL de m971,
- una bisagra de CD8-alfa humano (de CD8 $\alpha$ ),
- un dominio transmembranal de CD8-alfa( $\alpha$ ) humano,
- una molécula de señal coestimuladora de 4-1BB humano,
- un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización de CD3-zeta humano.

En una realización preferente, el receptor UCART22 de la invención comprende un scfv del anticuerpo m971 con un conector GS4 entre VH y VL y 2R entre VL y la bisagra de CD8-alfa.

En la presente invención, un scfv es una proteína de fusión de las regiones variables de la cadena pesada ( $V_{\text{dominio H}}$ ) de SEC ID n.º 12 y la cadena ligera ( $V_{\text{dominio L}}$ ) de SEC ID n.º 13 de una inmunoglobulina específica para CD22, m971, conectada con un péptido conector, preferentemente un conector de secuencia SEC ID n.º 10.

En una realización, dicho scfv de la invención comprende, además, una secuencia líder (o péptido de señal), preferentemente dicha secuencia líder está unida al dominio VH.

Una realización en la que dicha secuencia líder está unida al dominio VL constituye parte de la presente invención.

En una realización, un dominio VH está unido a una bisagra; en otra realización, un dominio VL está unido a dicha bisagra.

Preferentemente, la presente invención proporciona un CAR CD22 que comprende:

- un péptido de señal, por ejemplo un péptido de señal de CD8-alfa de SEC ID n.º 1,
- un scFv que comprende un dominio VH separado de un dominio VL por un conector, en donde dichos VH, VL y conector contribuyen a la unión a CD22,
- una bisagra de la cadena CD8-alfa humana,
- un dominio transmembranal (TM) de CD8-alfa( $\alpha$ ),
- una molécula de señal coestimuladora de 4-1BB humano,
- un dominio de señalización intracelular que comprende el dominio de señalización de CD3-zeta.

Uno de los CAR CD22 utilizados según la invención consiste en:

- una secuencia líder (por ejemplo, una secuencia líder de CD8 $\alpha$  o un péptido de señal de CD8 $\alpha$ ),
- un scfv anti-CD22 que comprende un VH, un conector y un VL, o un VL, un conector y un VH, en donde dichos VH y VL se derivan de m971,
- una bisagra de CD8 $\alpha$ ,
- una TM de CD8 $\alpha$ ,
- una molécula de señal coestimuladora de 4-1BB,
- un dominio de señalización intracelular CD3-zeta.

Uno de los CAR CD22 utilizados según la invención comprende, sucesivamente:

- un péptido de señal CD8 $\alpha$ , eliminable tras la expresión en la superficie celular,
- un epítipo reconocido por QBEN10 y un epítipo reconocido por rituximab,
- un scfv anti-CD22 que comprende un VH, un conector y un VL, en donde dichos VH y VL de m971 son dos epítipos sucesivos reconocidos por rituximab,
- una bisagra de CD8 $\alpha$ ,
- una TM de CD8 $\alpha$ ,
- una molécula de señal coestimuladora de 4-1BB,
- un dominio de señalización intracelular CD3-zeta.

Uno de los CAR CD22 utilizados según la invención comprende, sucesivamente:

- un péptido de señal CD8 $\alpha$ , eliminable tras la expresión en la superficie celular,
- un epítipo reconocido por QBEN10 y un epítipo reconocido por rituximab,
- un scfv anti-CD22 que comprende un VH, un conector y un VL, en donde dichos VH y VL de m971 son dos epítipos sucesivos reconocidos por rituximab,
- una TM de CD8 $\alpha$ ,
- una molécula de señal coestimuladora de 4-1BB,
- un dominio de señalización intracelular CD3-zeta.

Uno de los CAR CD22 utilizados según la invención comprende, sucesivamente:

- un péptido de señal CD8 $\alpha$ , eliminable tras la expresión en la superficie celular,
- un scfv anti-CD22 que comprende un VH, un conector y un VL, en donde dichos VH y VL de m971 son dos epítomos sucesivos reconocidos por rituximab,
- una bisagra de CD8,
- una TM de CD8,
- una molécula de señal coestimuladora de 4-1BB,
- un dominio de señalización intracelular CD3-zeta.

Uno de los CAR CD22 utilizados según la invención comprende, sucesivamente:

- un péptido de señal CD8 $\alpha$ , eliminable tras la expresión en la superficie celular,
- un scfv anti-CD22 que comprende un VH, un conector y un VL, siendo dichos VH y VL de m971, dos epítomos sucesivos reconocidos por rituximab,
- una TM de CD8,
- una molécula de señal coestimuladora de 4-1BB,
- un dominio de señalización intracelular CD3-zeta.

Uno de los CAR CD22 utilizados según la invención comprende, sucesivamente:

- un péptido de señal CD8 $\alpha$ , eliminable tras la expresión en la superficie celular,
- un scfv anti-CD22 que comprende un VH, un conector y un VL, siendo dichos VH y VL de m971, un scfv anti-CD19,
- dos epítomos sucesivos reconocidos por rituximab,
- una bisagra de CD8,
- una TM de CD8,
- una molécula de señal coestimuladora de 4-1BB,
- un dominio de señalización intracelular CD3-zeta.

Uno de los CAR CD22 utilizados según la invención comprende, sucesivamente:

- un péptido de señal CD8 $\alpha$ , eliminable tras la expresión en la superficie celular,
- un scfv anti-CD22 que comprende un VH, un conector y un VL, siendo dichos VH y VL de m971, un scfv anti-CD19,
- dos epítomos sucesivos reconocidos por rituximab,
- una TM de CD8,
- una molécula de señal coestimuladora de 4-1BB,
- un dominio de señalización intracelular CD3-zeta.

Uno de los CAR CD22 utilizados según la invención comprende, sucesivamente:

- un péptido de señal CD8 $\alpha$ , eliminable tras la expresión en la superficie celular,
- un scfv anti-CD19 y un scfv anti-CD22 que comprende un VH, un conector y un VL, siendo dichos VH y VL de m971,
- dos epítomos sucesivos reconocidos por rituximab,
- una bisagra de CD8 $\alpha$ ,
- una TM de CD8 $\alpha$ ,
- una molécula de señal coestimuladora de 4-1BB,
- un dominio de señalización intracelular CD3-zeta.

Uno de los CAR CD22 utilizados según la invención comprende, sucesivamente:

- un péptido de señal CD8 $\alpha$ , eliminable tras la expresión en la superficie celular,
- un scfv anti-CD19 y un scfv anti-CD22 que comprende un VH, un conector y un VL, siendo dichos VH y VL de m971, dos epítomos sucesivos reconocidos por rituximab,
- una TM de CD8 $\alpha$ ,
- una molécula de señal coestimuladora de 4-1BB,
- un dominio de señalización intracelular CD3-zeta.

#### CONECTOR-SCFV

Un conector puede ser, por ejemplo, un multímero del pentapéptido (GGGGS) $_n$  o (G $_4$ S) $_n$  o (Gly $_4$ Ser) $_n$  con  $n=1$  a  $4$ , preferentemente  $n=3$ , el 18-mero GGSSRSSSSGGGGSGGGG (Andris-Widhopf et al., 2011) y el 20-mero (G $_4$ S) $_4$  (Schaefer et al., 2010). Un conector puede incluir secuencias con funcionalidades añadidas, p. ej., una etiqueta epítomo (Sblattero y Bradbury, 2000 Nature Biotechnology 18, 75 - 80), por lo menos en la secuencia SEC ID n.º 20,

preferentemente 2 secuencias, separadas por un conector, que mejoran las propiedades de scFv de la presente invención, con frecuencia en el contexto de secuencias de anticuerpo particulares.

Entre otros conectores adecuados en la presente invención se encuentra el conector peptídico 15-mero (RGRGRGRGRSRGGGS) (Zhihong Shen, Heping Yan, Ying Zhang, Raymond L. Mernaugh y Xiangqun Zeng (2008), Anal Chem. 80(6): 1910-1917).

En una realización preferente, un conector que une VH a la secuencia de VL de m971 (o VL a la secuencia VH) es un conector de fórmula  $(G_4S)_n$  en la que n es 1 a 3, preferentemente n=3, de secuencia  $(G_4S)_3$  (SEC ID n.º 10).

En una realización, la presente invención utiliza:  
un CAR CD22 que comprende:

- una secuencia líder de CD8 $\alpha$  humano (líder CD8 $\alpha$  o péptido de señal CD8 $\alpha$ ) de SEC ID n.º 1,
- un scfv anti-CD22 que comprende un VH de SEC ID n.º 12, un conector de SEC ID n.º 10 y un VL de SEC ID n.º 13, una bisagra de CD8 $\alpha$  humano de SEC ID n.º 4,
- un TM de CD8 $\alpha$  humano de SEC ID n.º 6,
- una molécula de señal coestimuladora de 4-1BB de SEC ID n.º 8,
- un dominio de señalización intracelular CD3-zeta de SEC ID n.º 9.

En una realización, la presente invención utiliza un receptor de antígeno quimérico específico de CD22 (CAR CD22) que comprende:

- un péptido de señal que presenta una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencias de por lo menos 80 %, más preferentemente de por lo menos 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % respecto al polipéptido de SEC ID n.º 1 o n.º 2, preferentemente el péptido de señal presenta una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencias de por lo menos 80 %, más preferentemente de por lo menos 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % respecto al polipéptido de SEC ID n.º 1,
- un dominio VH separado de un dominio VL por un conector, dichos VH y VL que contribuyen a la unión a CD22; dicho conector presenta una identidad de secuencias de por lo menos 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % respecto al polipéptido de SEC ID n.º 10,

dicho dominio VH que presenta una identidad de secuencias de por lo menos 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % respecto al polipéptido de SEC ID n.º 12,

dicho dominio VL que presenta una identidad de secuencias de por lo menos 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % respecto al polipéptido de SEC ID n.º 13,

- una bisagra derivada de una cadena CD8-alfa humana que presenta una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencias de por lo menos 80 %, más preferentemente de por lo menos 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % respecto al polipéptido de SEC ID n.º 4,
- un dominio transmembranal derivado de CD8alfa ( $\alpha$ ) que presenta una de aminoácidos con una identidad de secuencias de por lo menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % respecto al polipéptido de SEC ID n.º 6,
- una molécula de señal coestimuladora derivada de 4-1BB (o dominio intracelular de 4-1BB) que presenta una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencias de por lo menos 70 %, preferentemente de por lo menos 80 %, más preferentemente por lo menos 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID n.º 8,
- una molécula de señalización intracelular que comprende el dominio de señalización de CD3-zeta que presenta una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencias de por lo menos 70 %, preferentemente de por lo menos 80 %, más preferentemente por lo menos 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID n.º 9.

En una realización preferente, el receptor de antígeno quimérico específico de CD22 (CAR CD22) de la presente invención no comprende ninguna secuencia de CD28 humano, en particular de dominio de señalización intracelular CD28 humano. En una realización más preferente, el receptor de antígeno quimérico específico de CD22 (CAR CD22) de la presente invención no comprende ninguna secuencia de CD28 humano, en particular de dominio de señalización intracelular CD28 humano y contiene, además, un péptido de señal de CD8 $\alpha$ , preferentemente fusionado con el dominio VH de un scfv específico para CD22.

En una realización, la presente invención utiliza un CAR CD22 de SEC ID n.º 15.

En una realización, la presente invención utiliza un CAR CD22 que presenta una secuencia de aminoácidos con una identidad de por lo menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % respecto al polipéptido de SEC ID n.º 15.



En una realización, la presente invención utiliza un CAR CD22 codificado por un polinucleótido que presenta una secuencia con una identidad de por lo menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % respecto al polinucleótido de SEC ID n.º 22.

En una realización preferente, el CAR CD22 utilizado según la invención comprende la secuencia siguiente:

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRG  
LEWLGRITYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDI  
WGQGTMTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQTIWSYLNWYQ  
QRP GKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQSYSIPQTFGQGTKEI  
KTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITLY  
CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE  
LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD  
GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID N°15).

Secuencia de CAR CD22 con un péptido de señal de SEC ID n.º 2, un dominio TM de CD8α y un conector entre los dominios VH y VL:

M971 V3

METDTLLLVVLLWVPGSTGQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSR  
GLEWLGRITYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDI  
IWGQGTMTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQTIWSYLNWYQ  
QRP GKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQSYSIPQTFGQGTKEI  
KTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITLY  
CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE  
LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD  
GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR.

En una realización, la presente invención proporciona las secuencias siguientes:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRITYYRSKWYNDYAV  
SVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDI WGQGTMTVSSGGGGSGG  
GGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQTIWSYLNWYQ QRP GKAPNLLIYAASSLQSGV  
PSRFSGRGSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQSYSIPQTFGQGTKEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS  
LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ  
TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPE  
MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ

ALPPR. En dicho CAR CD22 el péptido de señal está ausente.

En una realización, el receptor UCART22 de la presente invención comprende una secuencia SEC ID n.º 20.

ATGGCTCTGCCCCGTACCGCTCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGCTGCACGCAGCAAGACCAC  
 AGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCTGGCCTGGTGAAGCCAAGCCAGACACTGTCCCTGACCT  
 GCGCCATCAGCGGCGATTCCGTGAGCTCCAACCTCCGCCGCTGGAATTGGATCAGGCAGTCCCC  
 TTCTCGGGGCTGGAGTGGCTGGGAAGGACATACTATCGGTCTAAGTGGTACAACGATTATGC  
 CGTGTCTGTGAAGAGCAGAATCACAATCAACCCTGACACCTCCAAGAATCAGTTCTCTCTGCAG  
 CTGAATAGCGTGACACCAGAGGACACCGCCGTGTACTATTGCGCCAGGGAGGTGACCGGCGAC  
 CTGGAGGATGCCTTTGACATCTGGGGCCAGGGCACAATGGTGACCGTGTCTAGCGGAGGAGG  
 AGGATCCGGAGGAGGAGGATCTGGCGGCGGCGGAGCGATATCCAGATG (SEQ ID N° 20)

En una realización, el receptor UCART22 de la presente invención comprende una secuencia SEC ID n.º 22.

En una realización preferente, el UCART22 de la presente invención comprende una secuencia SEC ID n.º 22 insertada en un gen TRAC humano (tal como en el gen TRAC humano, cromosoma 14 - NC\_000014.9) y expresa en la superficie celular un CAR anti-CD22 específico para la parte proximal de CD22.

En una realización más preferente, el UCART22 de la presente invención comprende una secuencia SEC ID n.º 20 insertada en un gen TRAC humano (tal como en el gen TRAC humano, cromosoma 14 - NC\_000014.9) y expresa en la superficie celular un CAR anti-CD22 específico para la parte distal de CD22.

Un dominio de unión anti-CD22 específico para la parte distal de CD22 puede expresarse solo o con un dominio de unión anti-CD22 específico para la parte proximal de CD22 en el receptor UCART22 de la invención.

En un aspecto, el dominio de unión anti-CD22 del CAR CD22 de la invención es un dominio de unión anti-CD22 optimizado.

Tal como se utiliza en la presente memoria, anticuerpo (o scfv) «optimizado» se refiere a formas de anticuerpos (o scfv) que son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina, o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina. Preferentemente, los anticuerpos son inmunoglobulinas humanas (anticuerpos receptores) en las que residuos de una región determinante de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) son sustituidos por residuos de una CDR para conseguir la especificidad, afinidad y capacidad deseadas.

La CDR donante puede experimentar pocos cambios de aminoácidos que afecten o alteren significativamente las características de unión del CAR CD22 de la invención. En efecto, uno de la invención proporcionada en la presente memoria es un CAR CD22 cuya unión a células expresantes de CD22 (y actividad citolítica) se mantiene, aunque la afinidad es modificada para reducir la intensidad de la respuesta (liberación de citoquinas).

Las modificaciones de aminoácidos son modificaciones de aminoácido conservadoras, incluyendo sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos en dicho fragmento de anticuerpo en dicho CAR y/o cualquiera de las demás partes de dicha molécula de CAR. Pueden introducirse modificaciones en un anticuerpo, en un fragmento de anticuerpo o en cualquiera de las demás partes de la molécula de CAR de la invención, mediante técnicas estándares conocidas, tales como la mutagénesis dirigida a sitio, la mutagénesis mediada por PCR o mediante la utilización de secuencias de línea germinal optimizadas.

En general, el CAR optimizado comprenderá sustancialmente la totalidad de por lo menos un, y normalmente dos, dominios variables, en donde la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de las regiones CDR corresponden a las de la inmunoglobulina humana original.

Entre las sustituciones conservadoras de aminoácidos se incluyen aquéllas en las que se sustituye el residuo aminoácido por un residuo aminoácido que presenta una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de residuos aminoácidos que presentan cadenas laterales similares. Entre estas familias se incluyen aminoácidos que presentan cadenas laterales básicas (por ejemplo lisina, arginina e histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo ácido aspártico y ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína y triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina y metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo treonina, valina e isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo tirosina, fenilalanina, triptófano e histidina). De esta manera, puede sustituirse uno o más residuos aminoácidos dentro de un CAR de la invención por otros residuos aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales y el CAR alterado puede someterse a ensayo utilizando los ensayos funcionales descritos en la presente memoria.

En una realización preferente, la presente invención utiliza un CAR CD22 que presenta modificaciones conservadoras de aminoácidos (o un cambio de secuencia de aminoácidos) en comparación con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de secuencia SEC ID n.º 15.

En una realización preferente, la presente invención utiliza un CAR CD22 que presenta una secuencia de aminoácidos con 2 cambios de aminoácido en comparación con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de secuencia SEC ID n.º 15.

En una realización preferente, la presente invención utiliza un CAR CD22 que presenta una secuencia de aminoácidos con 3 cambios de aminoácido en comparación con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de secuencia SEC ID n.º 15.

En una realización preferente, la presente invención utiliza un CAR CD22 que presenta una secuencia de aminoácidos con 4 cambios de aminoácido en comparación con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de secuencia SEC ID n.º 15.

En una realización preferente, la presente invención utiliza un CAR CD22 que presenta una secuencia de aminoácidos con 5 cambios de aminoácido en comparación con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de secuencia SEC ID n.º 15.

En una realización más preferente, la presente invención utiliza un CAR CD22 que presenta una secuencia de aminoácidos con 5 cambios de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de SEC ID n.º 15 y por lo menos una CDR en la SEC ID n.º 15 está conservada.

En una realización más preferente, la presente invención utiliza un CAR CD22 que presenta una secuencia de aminoácidos con 1 a 15 cambios de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de SEC ID n.º 15 y por lo menos una CDR en la SEC ID n.º 15 está conservada.

En una realización preferente, la secuencia de CAR CD22 utilizada según la invención se modifica mediante el cambio de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos en comparación con el CAR CD22 de tipo salvaje, a fin de reducir la HAMA (respuesta humana antirratón, por sus siglas en inglés) sin afectar a la capacidad de unión de dicho CAR a su diana (CD22).

En una realización preferente, la presente invención utiliza un CAR CD22 que presenta una secuencia de aminoácidos con por lo menos 1 cambio de aminoácido en comparación con la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje (el tipo salvaje es m971), en donde dicho cambio o cambios de aminoácido no presentan ningún impacto o mejorar la unión y/o la actividad de dicho CAR CD22 en las células T primarias.

Las características de unión pueden modificarse utilizando técnicas adaptadas descritas inicialmente en Mitchell Ho, Satoshi Nagata e Ira Pastan. Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells PNAS 2006103 (25) 9637-9642; publicado antes de la impresión el 8 de junio de 2006, doi:10.1073/pnas.0603653103.

Los scfv optimizados también portan por lo menos una mutación equivalente a las mutaciones Pro-91-Thr-92 (PT) Gly-91-Ala-92 y Val-91-Phe-92.

En una realización, la presente invención proporciona un CAR anti-CD22 que comprende:

- un dominio extracelular que comprende:

- un péptido de señal

- un dominio de unión a ligando optimizado opcionalmente que comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo monoclonal anti-CD22 que presenta una de las mutaciones siguientes: Pro-91-Thr-92 (PT), Gly-91-Ala-92, Val-91-Phe-92, o equivalente,

- una bisagra, que comprende una bisagra de CD8-alfa ( $\alpha$ ),

- un dominio transmembranal de CD8-alfa, y

- un dominio citoplasmático que comprende un dominio de señalización CD3-zeta y un dominio coestimulador de 4-1BB.

En una realización preferente, la presente invención proporciona un CAR anti-CD22 tal como anteriormente, en donde dicho anticuerpo monoclonal anti-CD22 es del anticuerpo m971 con puntos calientes en las CDR. Preferentemente, una de las mutaciones siguientes: Pro-91-Thr-92 (PT), Gly-91-Ala-92, Val-91-Phe-92.

En una realización más preferente, la presente invención proporciona una célula T inmunitaria aislada modificada (inactivada para TCR y dCK) que comprende un CAR anti-CD22 que comprende:

- Un dominio extracelular que comprende:

un péptido de señal, un dominio de unión a ligando que comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo monoclonal anti-CD22 que presenta por lo menos una de las mutaciones siguientes: Pro-91-Thr-92, Gly-91-Ala-92; Val-91-Phe-92 ,

una bisagra, que comprende una bisagra de CD8-alfa ( $\alpha$ ),

- un dominio transmembranal de CD8-alfa, y
- un dominio citoplasmático que comprende un dominio de señalización CD3-zeta y un dominio coestimulador de 4-1BB.

En una realización más preferente, la presente invención proporciona una célula T inmunitaria aislada modificada (inactivada para TCR y CD52) que comprende un CAR anti-CD22 que comprende:

- un dominio extracelular que comprende:

un péptido de señal, un dominio de unión a ligando que comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo monoclonal anti-CD22 que presenta por lo menos una de las mutaciones siguientes: Pro-91-Thr-92, Gly-91-Ala-92; Val-91-Phe-92 ,

una bisagra, que comprende una bisagra de CD8-alfa ( $\alpha$ ),

- un dominio transmembranal de CD8-alfa, y
- un dominio citoplasmático que comprende un dominio de señalización CD3-zeta y un dominio coestimulador de 4-1BB.

En una realización más preferente, la presente invención proporciona una célula T inmunitaria aislada modificada (inactivada para TCR, CD52 y dCK) que comprende un CAR anti-CD22 que comprende:

- un dominio extracelular que comprende:

un péptido de señal, un dominio de unión a ligando que comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo monoclonal anti-CD22 que presenta por lo menos una de las mutaciones siguientes: Pro-91-Thr-92, Gly-91-Ala-92; Val-91-Phe-92 ,

una bisagra, que comprende una bisagra de CD8-alfa ( $\alpha$ ),

- un dominio transmembranal de CD8-alfa, y
- un dominio citoplasmático que comprende un dominio de señalización CD3-zeta y un dominio coestimulador de 4-1BB.

En un aspecto, el CAR22 puede coexpresarse en la superficie celular con por lo menos un, preferentemente dos, más preferentemente tres epítomos específicos de anticuerpo monoclonal (mAb), en donde dichos epítomos específicos de mAb pueden estar fusionados con un dominio transmembranal de CD8. En una realización, dicho epítomo específico de mAb es un epítomo reconocido por rituximab y/o de QBEN10 y el péptido coexpresado con CAR CD22 es RQR8.

En otra realización, por lo menos dos, preferentemente tres, epítomos específicos de anticuerpo monoclonal (mAb), pueden insertarse en el conector L del scfv (de unión de VH al VL) específico para CD22 y/o en la bisagra del CAR CD22.

El mAb específico de epítomo puede utilizarse para la separación celular *in vitro* y/o el agotamiento celular *in vivo* de células inmunitarias expresantes de CD22.

En realizaciones particulares, el dominio de unión extracelular del CAR CD22 utilizado según la invención puede comprender una de las secuencias siguientes:

V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-(L)<sub>x</sub>-Epítomo1-(L)<sub>x</sub>;  
V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-(L)<sub>x</sub>-Epítomo1-(L)<sub>x</sub>-Epítomo2-(L)<sub>x</sub>;  
V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-(L)<sub>x</sub>-Epítomo1-(L)<sub>x</sub>-Epítomo2-(L)<sub>x</sub>-Epítomo3-(L)<sub>x</sub>;  
(L)<sub>x</sub>-Epítomo1-(L)<sub>x</sub>-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>;  
(L)<sub>x</sub>-Epítomo1-(L)<sub>x</sub>-Epítomo2-(L)<sub>x</sub>-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>;  
Epítomo1-(L)<sub>x</sub>-Epítomo2-(L)<sub>x</sub>-Epítomo3-(L)<sub>x</sub>-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>;  
(L)<sub>x</sub>-Epítomo1-(L)<sub>x</sub>-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-(L)<sub>x</sub>-Epítomo2-(L)<sub>x</sub>;  
(L)<sub>x</sub>-Epítomo1-(L)<sub>x</sub>-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-(L)<sub>x</sub>-Epítomo2-(L)<sub>x</sub>-Epítomo3-(L)<sub>x</sub>;

$(L)_x$ -Epítopo1-(L)<sub>x</sub>-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-(L)<sub>x</sub>-Epítopo2-(L)<sub>x</sub>-Epítopo3-(L)<sub>x</sub>-Epítopo4-(L)<sub>x</sub>;  
 $(L)_x$ -Epítopo1-(L)<sub>x</sub>-Epítopo2-(L)<sub>x</sub>-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-(L)<sub>x</sub>-Epítopo3-(L)<sub>x</sub>;  
 $(L)_x$ -Epítopo1-(L)<sub>x</sub>-Epítopo2-(L)<sub>x</sub>-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-(L)<sub>x</sub>-Epítopo3-(L)<sub>x</sub>-Epítopo4-(L)<sub>x</sub>;  
V<sub>1</sub>-(L)<sub>x</sub>-Epítopo1-(L)<sub>x</sub>-V<sub>2</sub>;  
V<sub>1</sub>-(L)<sub>x</sub>-Epítopo1-(L)<sub>x</sub>-V<sub>2</sub>-(L)<sub>x</sub>-Epítopo2-(L)<sub>x</sub>;  
V<sub>1</sub>-(L)<sub>x</sub>-Epítopo1-(L)<sub>x</sub>-V<sub>2</sub>-(L)<sub>x</sub>-Epítopo2-(L)<sub>x</sub>-Epítopo3-(L)<sub>x</sub>;  
V<sub>1</sub>-(L)<sub>x</sub>-Epítopo1-(L)<sub>x</sub>-V<sub>2</sub>-(L)<sub>x</sub>-Epítopo2-(L)<sub>x</sub>-Epítopo3-(L)<sub>x</sub>-Epítopo4-(L)<sub>x</sub>;  
(L)<sub>x</sub>-Epítopo1-(L)<sub>x</sub>-V<sub>1</sub>-(L)<sub>x</sub>-Epítopo2-(L)<sub>x</sub>-V<sub>2</sub>; o  
(L)<sub>x</sub>-Epítopo1-(L)<sub>x</sub>-V<sub>1</sub>-(L)<sub>x</sub>-Epítopo2-(L)<sub>x</sub>-V<sub>2</sub>-(L)<sub>x</sub>-Epítopo3-(L)<sub>x</sub>;

en donde,

V<sub>1</sub> es VL de SEC ID n.º 12 y V<sub>2</sub> es VH de SEC ID n.º 13 o V<sub>1</sub> es VH y V<sub>2</sub> es VL;

L<sub>1</sub> es un conector adecuado para unir la cadena VH a la cadena VL, preferentemente de secuencia SEC ID n.º 10.

L es un conector que comprende residuos de glicina y serina, y cada aparición de L en el dominio de unión extracelular puede ser idéntico o diferente a otra aparición de L en el mismo dominio de unión extracelular, y x es 0 o 1, y cada aparición de x se selecciona independientemente de las demás, y los epítopos 1, 2 y 3 son epítopos específicos de mAb y pueden ser idénticos o diferentes.

En una realización, el dominio de unión extracelular comprende una de las secuencias siguientes: V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-L-Epítopo1; V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-L-Epítopo1-L; V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-L-Epítopo1-L-Epítopo2; V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-L-Epítopo1-L-Epítopo2-L; V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-L-Epítopo1-L-Epítopo2-L-Epítopo3; V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-L-Epítopo1-L-Epítopo2-L-Epítopo3-L; V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-Epítopo1; V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-Epítopo1-L; V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-Epítopo1-L-Epítopo2; V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-Epítopo1-L-Epítopo2-L; V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-Epítopo1-L-Epítopo2-L-Epítopo3; V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-Epítopo1-L-Epítopo2-L-Epítopo3-L; Epítopo1-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; Epítopo1-L-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; L-Epítopo1-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; L-Epítopo1-L-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; Epítopo1-L-Epítopo2-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; Epítopo1-L-Epítopo2-L-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; L-Epítopo1-L-Epítopo2-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; L-Epítopo1-L-Epítopo2-L-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; Epítopo1-L-Epítopo2-L-Epítopo3-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; Epítopo1-L-Epítopo2-L-Epítopo3-L-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; L-Epítopo1-L-Epítopo2-L-Epítopo3-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; L-Epítopo1-L-Epítopo2-L-Epítopo3-L-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>; V<sub>1</sub>-L-Epítopo1-L-V<sub>2</sub>; L-Epítopo1-L-V<sub>1</sub>-L-Epítopo2-L-V<sub>2</sub>; V<sub>1</sub>-L-Epítopo1-L-V<sub>2</sub>-L-Epítopo2-L; V<sub>1</sub>-L-Epítopo1-L-V<sub>2</sub>-L-Epítopo2-L-Epítopo3; V<sub>1</sub>-L-Epítopo1-L-V<sub>2</sub>-L-Epítopo2-L-Epítopo3-Epítopo4; L-Epítopo1-L-V<sub>1</sub>-L-Epítopo2-L-V<sub>2</sub>-L-Epítopo3-L; Epítopo1-L-V<sub>1</sub>-L-Epítopo2-L-V<sub>2</sub>-L-Epítopo3-L; L-Epítopo1-L-V<sub>1</sub>-L-Epítopo2-L-V<sub>2</sub>-L-Epítopo3; L-Epítopo1-L-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-L-Epítopo2-L; L-Epítopo1-L-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-L-Epítopo2-L-Epítopo3; L-Epítopo1-L-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-L-Epítopo2-Epítopo3, o Epítopo1-L-V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-L-Epítopo2-L-Epítopo3-Epítopo4, en donde:

V<sub>1</sub> es VL y V<sub>2</sub> es V<sub>H</sub> o V<sub>1</sub> es V<sub>H</sub> y V<sub>2</sub> es V<sub>L</sub>; y V<sub>H</sub>, y V<sub>L</sub> son V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> optimizados de m971;

L<sub>1</sub> es cualquier conector adecuado para unir la cadena V<sub>H</sub> a la cadena V<sub>L</sub>;

L es un conector que comprende residuos de glicina y serina, y cada aparición de L en el dominio de unión extracelular puede ser idéntico o diferente a otra aparición de L en el mismo dominio de unión extracelular, y los epítopos 1, 2 y 3 son epítopos específicos de mAb y pueden ser idénticos o diferentes.

L<sub>1</sub> es un conector que comprende glicina y/o serina, preferentemente, L<sub>1</sub> es un conector que comprende la secuencia de aminoácidos (Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub> o (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub>, donde n es 1, 2, 3, 4 o 5 o un conector que comprende la secuencia de aminoácidos (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub> o (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>. De manera similar, L es un conector que comprende glicina y/o serina, preferentemente L es un conector que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de SGG, GGS, SGGG, SSGG, GGGG, SGGGG, GGGGS, SGGGGS, GGGGGS, SGGGGGS, SGGGGG, GSGGGGS, GGGGGGS, SGGGGGG, SGGGGGGG, SGGGGGGGS y SGGGGSGGGGS, preferentemente L es un SGGGG, GGGGS o SGGGGS.

Los epítopos 1, 2, 3 y 4 son reconocidos por el rituximab o por QBEND-10. En una realización preferente, el epítopo específico de mAb es un epítopo específico de mAb que presenta una secuencia de aminoácidos ELPTQGTFNSVSTNVSPAKPTTTA y/o CPYSNPCL (SEC ID n.º 19).

En una realización preferente, el CAR CD22 utilizado según la invención comprende 3 epítopos específicos de mAb que presenta la secuencia de aminoácidos CPYSNPCL (R) y uno que presenta la secuencia de aminoácidos ELPTQGTFNSVSTNVSPAKPTTTA (Q).

En una realización todavía más preferente, el CAR CD22 de la invención comprende 2 epítopos específicos de mAb que presentan una secuencia de aminoácidos CPYSNPCL (R) situada en la parte NT de la bisagra, inmediatamente después de la VL.

[En un aspecto, por lo menos una secuencia en la que se une el rituximab a (R) y/o una secuencia en la que se une QBEN a (Q) puede insertarse dentro del conector GGGGSGGGSGGGGS y/o en la bisagra, tal como se ha descrito anteriormente (documento n.º WO2016120216).

En una realización particular, el CAR CD22 utilizado según la presente invención es un CAR de cadena sencilla (CARcs).

En realizaciones particulares, el CAR anti-CD22 de cadena sencilla de la invención comprende un scfv de m971 y por lo menos otro dominio de unión, preferentemente específico para la parte distal de CD22, alternativamente para otro antígeno de célula B, especialmente si es expresado por neoplasias malignas de células B, tales como CD34, CD10, CD79a, CD20, IgD, CD5, CD23, CD19, STATS, CD3, CD30 o BCMA.

#### *Polinucleótidos, vectores:*

Se dan a conocer, aunque no es parte de la invención, polinucleótidos y vectores codificantes del CAR CD22 anteriormente descrito utilizado según la invención.

Un polinucleótido puede consistir en un casete de expresión o vector de expresión (p. ej., un plásmido para la introducción en una célula huésped bacteriana o un vector vírico, tal como un vector baculovirus para la transfección de una célula huésped de insecto, o un vector plasmídico o vírico, tal como un lentivirus o un virus adenoasociado para la introducción en una célula huésped de mamífero, preferentemente humana).

En un caso particular, las diferentes secuencias de ácidos nucleicos pueden incluirse en un polinucleótido o vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una secuencia de salto ribosómico, tal como una secuencia codificante de un péptido 2A. Los péptidos 2A, que han sido identificados en el subgrupo aftovirus de picornavirus, causa un «salto» ribosómico de un codón al siguiente sin la formación de un enlace peptídico entre los dos aminoácidos codificados por los codones (ver Donnelly y Elliott, 2001; Atkins, Wills et al., 2007; Doronina, Wu et al. 2008)).

Se da a conocer un vector en la figura 4 codificante de un RQR8 y un CAR anti-CD22 unidos mediante un péptido 2A.

El término «codón» se refiere a tres nucleótidos en un ARNm (o en la cadena de sentido de una molécula de ADN) que son traducidos por un ribosoma en un residuo aminoácido. de esta manera, pueden sintetizarse dos polipéptidos a partir de un solo marco de lectura abierta contiguo dentro de un ARNm al estar separados los polipéptidos por una secuencia oligopeptídica 2A que está en el mismo marco. Dichos mecanismos de salto ribosómico son bien conocidos de la técnica y es conocida su utilización por varios vectores para la expresión de varias proteínas codificadas por un único ARN mensajero.

Otro objetivo de la presente exposición es un vector que permite la expresión de un CAR CD22 utilizado según la invención en una célula. En un caso preferente, dicho vector permite la expresión transitoria del CAR CD22. En un caso más preferente, dicho vector permite la expresión constitutiva y estable de un CAR CD22 utilizado según la invención mediante la inserción de la secuencia codificante de dicho CAR CD22 en el genoma de una célula.

La expresión del CAR CD22 utilizado según la invención y/o la supervivencia de la célula expresante del CAR CD22 puede controlarse utilizando un gen bajo el control de un promotor inducible tal como se describe en (R. Kuhn, F. Schwenk, M. Aguet, K. Rajewsky. Inducible gene targeting in mice. Science, 8 de septiembre de 1995: vol. 269, n.º 5229, páginas 1427-1429. DOI:10.1126/science.7660125, y referencias citadas).

En una realización, se utiliza un CAR CD22 en el que el dominio extracelular comprende por lo menos dos mimotopos de CD20 de SEC ID n.º 19 (CPYSNPSLC) situados entre los dominios scfv de m971 y la bisagra de CD8-alfa humano. El documento de patente n.º WO2016120216A1 da a conocer un método para la preparación de dichas construcciones.

Se da a conocer, aunque no es parte de la invención, un vector que comprende la secuencia SEC ID n.º 22.

Para dirigir el polipéptido transmembranal a la ruta de secreción de una célula huésped, se proporciona una secuencia de señal secretoria (también conocida como secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre) en la secuencia polinucleótida o secuencia de vector. La secuencia de señal de secreción está operablemente ligada a la secuencia de ácido nucleico transmembranal, es decir, las dos secuencias están unidas en el marco de lectura correcto y posicionadas para dirigir el polipéptido de nueva síntesis a la ruta de secreción de la célula huésped. Las secuencias de señal secretoria normalmente se posicionan en orientación 5' respecto a la secuencia de ácido nucleico codificante del polipéptido de interés, aunque determinadas secuencias de señal secretoria pueden posicionarse en otros sitios en la secuencia de ácido nucleico de interés (ver, p. ej., Welch et al., patente US n.º 5.037.743; Holland et al., patente US n.º 5.143.830).

Preferentemente, el péptido de señal del CAR utilizado según la invención comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 1 de CD8-alfa humano.

El experto en la materia reconocerá que, en vista de la degeneración del código genético, son posibles considerables variaciones de la secuencia entre dichas moléculas polinucleótidas. Preferentemente, las secuencias de ácidos nucleicos presentan codones optimizados para la expresión en células de mamífero, preferentemente para la expresión en células humanas. La optimización se refiere al intercambio en una secuencia de interés de codones que

son generalmente raros en los genes de alto nivel de expresión de una especie dada por codones que son generalmente frecuentes en los genes de alta expresión de dichas especies, en donde dichos codones codifican los aminoácidos como los codones que se están intercambiando.

#### 5 *Métodos de modificación de células inmunitarias dotadas de CAR CD22:*

Se da a conocer, aunque no es parte de la invención, un método de preparación de células inmunitarias para la inmunoterapia que comprende introducir *ex vivo* en dichas células inmunitarias un polinucleótido o un vector codificante de uno de los CAR CD22 utilizados según la invención, preferentemente de SEC ID n.º 15 tal como se ha descrito anteriormente.

En un caso preferente, dichos polinucleótidos se incluyen en un vector en vista de que son establemente expresados en las células inmunitarias.

Según un caso adicional, dicho método comprende, además, la etapa de modificar genéticamente dicha célula para que resulte más adecuada para la transferencia adoptiva, y/o para la utilización con un fármaco que afecta a la supervivencia de dicha célula inmunitaria, en particular para el trasplante (también denominado aloinjerto u homoinjerto) solo o en combinación con el fármaco para el que se ha hecho resistente la célula inmunitaria.

En este último caso, las células modificadas pueden aislarse inicialmente de un donante y utilizarse para una reinyección en el mismo donante en combinación con un fármaco al que se le ha hecho resistente.

Para la edición de un gen, lo que significa en la presente memoria, la modificación de un gen, o la inactivación de un gen, por ejemplo la mutación de un gen, la delección de un gen, la inserción de una secuencia en un gen, la modificación de la metilación de dicho gen (esto incluye el promotor del gen), etc., los métodos descritos en el documento n.º PA201670503 se ilustran en los ejemplos, posteriormente.

Los métodos descritos en MacLeod et al., Integration of a CD19 CAR into the TCR Alpha Chain Locus Streamlines Production of Allogeneic Gene-Edited CAR T Cells, Molecular Therapy (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.02.005> también son posibles alternativas al método utilizado para preparar CAR CD22 TCR KO.

El método se basa en mecanismos de reparación dirigidos por homología celular (HDR, por sus siglas en inglés) para «inactivar» un CAR CD22 en el gen TRAC (codificante de la subunidad alfa del TCR), resultando en un producto más eficiente.

El mecanismo HDR con una secuencia de ADN exógena se ha descrito previamente en células T utilizando oligonucleótidos cortos emparejados con CRISPR/Cas9. Otros han mostrado que puede utilizarse un virus adenoasociado (VAA) como molde junto con una nucleasa específica de sitio Crispr/Cas9 o MegaTAI para conseguir la inserción génica mediante HDR. En la presente invención se proporciona un nuevo método que combina vectores virus adenoasociado (VAA) y TALEN para insertar un CAR en el gen de TCR.

En UCART22, puede utilizarse el vector VAA6 tras la edición génica utilizando una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN, por sus siglas en inglés) específica de un gen, tal como el gen TRAC (gen codificante de la subunidad alfa o el TCR) o cualquier gen dado a conocer en el documento n.º PCT/EP2017/076798.

Debido a que las TALEN son específicas para una secuencia de ADN y permiten la integración de una secuencia en un gen, preferentemente un gen TRAC, la presente invención proporciona, además, una célula inmunitaria modificada que comprende una secuencia codificante de un CAR, preferentemente CAR CD22, tal como se ha indicado anteriormente, localizada en una región precisa del gen TRAC determinado por la TALEN utilizada. La secuencia del gen TRAC de dicha célula inmunitaria modificada es única debido a la especificidad de la TALEN.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona una célula T modificada que comprende la secuencia siguiente:

(YYY)<sub>n</sub>-ZZZ-(XXX)<sub>m</sub>.

donde n es un valor entre 1 y por lo menos 10,

y m es un valor entre 1 y 100, preferentemente m>100 y representa el número de pares de bases de la secuencia que va a integrarse,

en donde ZZZ codifica un péptido autoescindible, tal como un péptido 2A, en el mismo marco que la secuencia codificante de TRAC,

Y es A o T o G o C y flanquea o comprende una secuencia del gen TRAC que es diana de una TALEN que comprende por lo menos ttgtccacagATATC, preferentemente ttgtccacagATATCCAG y (XXX)<sub>n</sub> es A o T o G o C y es parte de una secuencia exógena que va a insertarse en el gen TRAC, preferentemente una secuencia codificante de un CAR, más preferentemente una secuencia codificante de un CAR CD22.

En una realización, el gen TRAC se ha deletado y el gen insertado se expresa bajo el control del promotor de TRAC.

5 Pueden interponerse secuencias adicionales o alternativas, tales como el sitio interno de entrada ribosómica (IRES, por sus siglas en inglés), entre la diana de TALEN y XXX.

En la presente invención, la diana de TALEN es la secuencia SEC ID n.º 21 y el CAR CD22 es la secuencia SEC ID n.º 22.

10 En una realización, la secuencia cortada por dicha TALEN es AGAACCTGACCCTG. La secuencia AGAACCTGACCCTG puede estar conservada por lo menos en parte (ver la figura 9) en una célula modificada de la invención, dependiendo de la secuencia insertada.

15 La presente invención proporciona una célula T modificada que comprende un gen TRAC que comprende la secuencia SEC ID n.º 22.

La presente invención proporciona una célula T modificada que comprende una secuencia codificante de un CAR específico para CD19 o una secuencia codificante de un CAR específico para CD22 insertado en el gen de TRAC, preferentemente en cualquier sitio en el locus :AGAACCTGACCCTG.

20 De esta manera, en realizaciones particulares, la célula T modificada de la invención comprende dos secuencias diferentes codificantes de un CAR y expresa dichos dos CAR diferentes. En la superficie celular, el nivel de TCR es indetectable.

25 De esta manera, en realizaciones particulares, la célula T modificada de la invención comprende dos secuencias diferentes codificantes de un CAR y expresa dichos dos CAR diferentes. En la superficie celular, el nivel de TCR y de CHM de clase I es indetectable.

30 La célula T modificada de la invención comprende en su gen TRAC genómico, una secuencia SEC ID n.º 22 y otra secuencia genómica en la que se ha insertado otro gen exógeno codificante de un CAR específico para CD19.

La célula T modificada de la invención comprende en su gen TRAC genómico, una secuencia SEC ID n.º 22 y otra secuencia genómica en la que se ha insertado otro gen exógeno codificante de un CAR específico para CD34.

35 La célula T modificada de la invención comprende en su gen TRAC genómico, una secuencia SEC ID n.º 22 y otra secuencia genómica en la que se ha insertado otro gen exógeno codificante de un CAR específico para CD79a.

La célula T modificada de la invención comprende en su gen TRAC genómico, una secuencia SEC ID n.º 22 y otra secuencia genómica en la que se ha insertado otro gen exógeno codificante de un CAR específico para CD79b.

40 La célula T modificada de la invención comprende en su gen TRAC genómico, una secuencia SEC ID n.º 22 y otra secuencia genómica en la que se ha insertado otro gen exógeno codificante de un CAR específico para CD10.

45 La célula T modificada de la invención comprende en su gen TRAC genómico, una secuencia SEC ID n.º 22 y otra secuencia genómica en la que se ha insertado otro gen exógeno codificante de un CAR específico para IgD.

La célula T modificada de la invención comprende en su gen TRAC genómico, una secuencia SEC ID n.º 22 y otra secuencia genómica en la que se ha insertado otro gen exógeno codificante de un CAR específico para CD5.

50 La célula T modificada de la invención comprende en su gen TRAC genómico, una secuencia SEC ID n.º 22 y otra secuencia genómica en la que se ha insertado otro gen exógeno codificante de un CAR específico para CD23.

55 La célula T modificada de la invención comprende en su gen TRAC genómico, una secuencia SEC ID n.º 22 y otra secuencia genómica en la que se ha insertado otro gen exógeno codificante de un CAR específico para CD30.

La célula T modificada de la invención comprende en su gen TRAC genómico, una secuencia SEC ID n.º 22 y otra secuencia genómica en la que se ha insertado otro gen exógeno codificante de un CAR específico para BCMA.

60 La célula T modificada de la invención comprende en su gen TRAC genómico, una secuencia SEC ID n.º 22 y otra secuencia genómica en la que se ha insertado otro gen exógeno codificante de un CAR específico para FLT3.

La célula T modificada de la invención comprende en su gen TRAC genómico, una secuencia SEC ID n.º 22 y otra secuencia genómica en la que se ha insertado otro gen exógeno codificante de un CAR específico para CD138.



La célula T modificada de la invención comprende en su gen TRAC genómico, una secuencia SEC ID n.º 22 y otra secuencia genómica en la que se ha insertado otro gen exógeno codificante de un CAR específico para CD80.

La célula T modificada de la invención comprende en su gen TRAC genómico, una secuencia SEC ID n.º 22 y otra secuencia genómica en la que se ha insertado otro gen exógeno codificante de un CAR específico para CD86.

Otra secuencia genómica en la que se inserta otro gen exógeno codificante de un segundo CAR puede ser cualquiera de los genes dados a conocer en el documento n.º PCT/EP2017/076798 o en el documento n.º WO2017069958A2.

El otro gen exógeno codificante de un CAR puede insertarse en el gen TRAC en el mismo marco con un péptido autoescindible y con la secuencia de CAR CD22, preferentemente SEC ID n.º o en otro gen codificante de una proteína tal como las dadas a conocer en el documento n.º PCT/EP2017/076798, o seleccionada de entre PD1 (Uniprot Q15116), CTLA4 (Uniprot P16410), PPP2CA (Uniprot P67775), PPP2CB (Uniprot P62714), PTPN6 (Uniprot P29350), PTPN22 (Uniprot Q9Y2R2), LAG3 (Uniprot P18627), HAVCR2 (Uniprot Q8TDQ0), BTLA (Uniprot Q7Z6A9), CD160 (Uniprot Q95971), TIGIT (Uniprot Q495A1), CD96 (Uniprot P40200), CRTAM (Uniprot Q95727), LAIR1 (Uniprot Q6GTX8), SIGLEC7 (Uniprot Q9Y286), SIGLEC9 (Uniprot Q9Y336), CD244 (Uniprot Q9BZW8), TNFRSF10B (Uniprot Q14763), TNFRSF10A (Uniprot Q00220), CASP8 (Uniprot Q14790), CASP10 (Uniprot Q92851), CASP3 (Uniprot P42574), CASP6 (Uniprot P55212), CASP7 (Uniprot P55210), FADD (Uniprot Q13158), FAS (Uniprot P25445), TGFBRII (Uniprot P37173), TGFBRI (Uniprot Q15582), SMAD2 (Uniprot Q15796), SMAD3 (Uniprot P84022), SMAD4 (Uniprot Q13485), SMAD10 (Uniprot B7ZSB5), SKI (Uniprot P12755), SKIL (Uniprot P12757), TGIF1 (Uniprot Q15583), IL10RA (Uniprot Q13651), IL10RB (Uniprot Q08334), HMOX2 (Uniprot P30519), IL6R (Uniprot P08887), IL6ST (Uniprot P40189), EIF2AK4 (Uniprot Q9P2K8), CSK (Uniprot P41240), PAG1 (Uniprot Q9NWQ8), SIT1 (Uniprot Q9Y3P8), FOXP3 (Uniprot Q9BZS1), PRDM1 (Uniprot Q60636), BATF (Uniprot Q16520), GUCY1A2 (Uniprot P33402), GUCY1A3 (Uniprot Q02108), GUCY1B2 (Uniprot Q8BXH3) y GUCY1B3 (Uniprot Q02153).

Los genes editados (KO) preferentes en UCART22 son TNFRSF10B (Uniprot Q14763), TNFRSF10A (Uniprot Q00220), IL10RA (Uniprot Q13651), IL10RB (Uniprot Q08334), TGFBRII (Uniprot P37173), TGFBRI (Uniprot Q15582), PD1 (Uniprot Q15116), CTLA4 (Uniprot P16410), LAG3 (Uniprot P18627), HAVCR2 (Uniprot Q8TDQ0) y TIGIT (Uniprot Q495A1).

Preferentemente, el gen en el que se inserta el segundo CAR es un gen genómico activo durante la activación de las células T seleccionado de cualquiera de los indicados en la Tabla A:

Tabla A

Símbolo	Descripción del gen
CD3G	CD3 gamma
Rn28s1	ARN ribosómico 28S
Rn18s	ARN ribosómico 18S
Rn7sk	ARN, 7SK, nuclear
Actg1	actina, gamma, citoplasmático 1
B2m	microglobulina beta -2
Rpl18a	proteína ribosómica L18A
Pabpc1	proteína de unión a poli(A), citoplasmática 1
Gapdh	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
Rpl19	proteína ribosómica L19
Rpl17	proteína ribosómica L17
Rplp0	proteína ribosómica, grande, P0
Cfl1	cofilina 1 no muscular
Pfn1	profilina 1

o en loci seguros, tal como se da a conocer en el documento n.º PCT/EP2017/076798 o en la Tabla AA

Tabla AA:

Zfp640	proteína 640 de dedos de zinc
LOC100038422	LOC100038422 no caracterizado
Zfp600	proteína 600 de dedos de zinc
Serp1b3a	inhibidor de serina (o cisteína) peptidasa, clado B (ovoalbúmina), miembro 3A
Tas2r106	receptor de gusto, tipo 2, miembro 106
Magea3	antígeno del melanoma, familia A, 3
Omt2a	maduración de ovocitos, alfa
Cpxcr1	región cromosómica CPX, candidato 1

(continuación)

Hsf3	factor transcripcional 3 de choque térmico
Pbsn	probasina
Sbp	proteína de unión a espermina
Wfdc6b	dominio central 6B de cuatro disulfuros de WAP
Meiob	específica de meiosis con dominios OB
Dnm3os	dinamina 3, cadena contraria
Skint11	selección y mantenimiento de células T intraepiteliales 11

El otro gen en el que puede insertarse el segundo CAR puede ser un gen codificante de cualquiera de las proteínas en la Tabla B, seleccionada de:

Tabla B

interleuquina-21
interleuquina-3
isopentenil-difosfato delta isomerasa 2
granzima C
receptor 8 de quimioquina (motivo C-C)
interleuquina-2
receptor de interleuquina-1, tipo I
superfamilia de (ligandos de) factor de necrosis tumoral, miembro 4
sensor de calcio neuronal 1
CDK5 y sustrato 1 de enzima Abl
proteína 2 transmembranal y que contiene repetición tetratricopéptido
dominio N-terminal de LON peptidasa y dedo anular-1
glucoproteína 49A
quinasa 2 similar a polo
lipasa, endotelial
inhibidor 1A de quinasa dependiente de ciclina (P21)
proteína grainyhead-like 1 ( <i>Drosophila</i> )
proteína II celular de unión a ácido retinoico
adenilato ciclasa 4
proteína 1B asociada a microtúbulos
miembro 6 de la familia de cadena larga de acil-CoA sintetasa
homeobox 2 de unión a la E-Box con dedos de zinc
antígeno CD200
carboxipeptidasa D
tiorredoxina reductasa 3
miosina IE
proteína de unión a ARN con corte y empalme múltiple 2
quinasa 3 de la proteína quinasa activada por mitógeno, cadena contraria
PERP, efector de apoptosis TP53
miosina X
proteína 3 de respuesta temprana inmediata
proteína 2 de interacción con la foliculina
receptor leucocitario de tipo inmunoglobulina, subfamilia B, miembro 4
represor asociado al ritmo circadiano de transcripción
receptor huérfano gamma relacionado con RAR
hélice arrollada 1 rica en prolina/serinas
proteína 2 rica en cisteínas
modulador del elemento de respuesta a AMPc
ligando 4 de quimioquina (motivo C-C)
receptor nuclear subfamilia 4, grupo A, miembro 2
transglutaminasa 2, polipéptido C
defectuoso en la sinapsis 1, Rho GTPasa, homólogo 2 ( <i>C. elegans</i> )
homólogo 1 de sprouty ( <i>Drosophila</i> )
factor 3 activador de transcripción
elemento transponible pogo con dominio KRAB
superfamilia de receptor de factor de necrosis tumoral, miembro 21
proteína que contiene SH2 inducible por citoquinas
linfotóxina A

oncogén de osteosarcoma FBJ
miembro 1 de la familia de moléculas de activación linfocítica de señalización
sindecán 3
proteína ribosómica mitocondrial L47
ladinina
factor 5 de transcripción E2F
modificador de tipo ubiquitina ISG15
receptor de hidrocarburo arilo
diacilglicerol O-aciltransferasa 2
oncogén B de osteosarcoma FBJ
dominio de tipo homología de pleckstrina, familia A, miembro 3
canal de potasio activado por voltaje, subfamilia Q, miembro 5
superfamilia de receptor de factor de necrosis tumoral, miembro 10b
gen 1 de huésped Mir17 (no codificante de proteína)
proteína 1 que contiene dominio de glucosa-fructosa oxidoreductasa
plexina A1
factor de choque térmico 2
carbohidrato sulfotransferasa 11
proteína 45 gamma de detención del crecimiento e inducible por daño en el ADN
proteína 5 de la familia de portadores de solutos (transportador de vitaminas dependiente de sodio), miembro 6
proteína transmembrana 3 inducida por interferón
5A que contiene dominio DENN/MADD
activador del plasminógeno, receptor de uroquinasa
proteína 19 de la familia de portadores de solutos (transportador de tiamina), miembro 2
proteína 2 que contiene dominio de ubiquitina
receptor nuclear subfamilia 4, grupo A, miembro 3
Proteína 52 de dedos de zinc
proteína 1 de dedo anular que contiene dominio SH3
dihidrouridina sintasa 2
quinasa 5 dependiente de ciclina, subunidad reguladora 1 (p35)
procesamiento del precursor 7, familia de la ribonucleasa P ( <i>S. cerevisiae</i> )
factor de crecimiento independiente 1
receptor de interleuquina-15, cadena alfa
proteína 1 de tipo BCL2
proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, S
proteína 1 de traslocación de variante del plasmacitoma
antígeno 2 de tipo fos
proteína X asociada a BCL2
proteína 4 de la familia de portadores de solutos, cotransportador de bicarbonato sódico, miembro 7
superfamilia de receptor de factor de necrosis tumoral, miembro 4
ligando 10 de quimioquina (motivo C-X-C)
quinasa 3 similar a polo
antígeno CD3E, proteína asociada a polipéptido epsilon
superfamilia de (ligandos de) factor de necrosis tumoral, miembro 11
polipéptido D (ARN) polimerasa li (dirigida por ADN)
proteína 2 de respuesta de crecimiento temprano
homólogo de DnaJ (Hsp40), subfamilia C, miembro 2
ADN topoisomerasa 1, mitocondrial
proteína 30D que contiene motivo tripartito
homólogo de DnaJ (Hsp40), subfamilia C, miembro 21
dominio SAM, dominio SH3 y señales de localización nuclear, 1
proteína 5 de la familia de portadores de solutos (transportadores de inositol), miembro 3
proteína ribosómica mitocondrial L15
fosfatasa 5 de especificidad dual
nucleasa potenciadora de apoptosis
variante ets 6
proteína de tipo dimetiladenosina transferasa 1 DIM1 ( <i>S. cerevisiae</i> )
proteína 1 de tipo 2',5'-oligoadenilato sintetasa
UTP18, componente de procesoma de subunidad pequeña (SSU, por sus siglas en inglés), homólogo (levadura)
proteína de interacción con BRCA2 y CDKN1A
proteína 3 de tipo sinaptotagmina

5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferasa reductasa
homólogo de proteína 2 de biogénesis ribosómica URB2 ( <i>S. cerevisiae</i> )
proteína de unión E2C a enzima conjugador de ubiquitina
desmetilasa 2B específica de lisina (K)
proteína 1 que contiene dominio queina ARNt-ribosiltransferasa
peptidasa 31 específica de ubiquitina
quinasa 2 de factor 2-alfa de inicio de traducción eucariótico
proteína 3A que contiene dominio AAA, familia de ATPasas
molécula de adhesión 1 de interacción con antígeno CXADR
SUMO/peptidasa 3 específica de sentrina
ESF1, proteína de procesamiento pre-ARNr nucleolar, homólogo ( <i>S. cerevisiae</i> )
desoxinucleotidiltransferasa, terminal, proteína de interacción 2
factor homeobox 1 inducido por TGFB
factor 1A de inicio de traducción eucariótico
proteína estimulada por interferón
proteína 2 similar a gen de adenoma pleomórfico
homólogo de proteína triptófano periódico PWP2 (levadura)
furina (enzima de corte de aminoácido básico apareado)
factor de necrosis tumoral
factor de transcripción antagonico de apoptosis
interferón, proteína 27 inducible alfa similar a 2A
ST6 (alfa-N-acetil-neuraminil-2,3-beta-galactosil-1,3)-N-acetilgalactosaminida alfa-2,6-sialiltransferasa 4
proteína 2 similar a metiltransferasa
homólogo 1 de notchless ( <i>Drosophila</i> )
proteína ribosómica mitocondrial L3
proteína 2A dominio UBX
proteína 2 similar a proteína de unión a nucleótido guanina (nucleolar)
proteína 11 de muerte celular programada
quinasa 8 dependiente de ciclina
factor 5B de inicio de traducción eucariótico
proteína 1 similar a fosfato ciclada ARN-terminal
cofactor NSFL1 (p97) (p47)
inhibidor de factor nuclear del intensificador génico del polipéptido cadena ligera kappa en células B, delta
fosfoproteína 10 de fase M (ribonucleoproteína nucleolar pequeña U3)
proteína 1B que contiene dominio GRAM
proteína similar a ERO1 ( <i>S. cerevisiae</i> )
receptor nuclear subfamilia 4, grupo A, miembro 1
Proteína 2 de gen <i>surfeit</i>
N(alfa)-acetiltransferasa 25, subunidad auxiliar de NatB
proteína que contiene dominio yrdC ( <i>E. coli</i> )
miembro 4 de la familia de dominios de ribonucleoproteína La
proteína 1 que contiene dominio SDA1
importina 4
coestimulador inducible de células T
proteína 7 de la familia de portadores de solutos (transportador de aminoácidos catiónicos, sistema y+), miembro 1
transportador de arsenito arsA, de unión a ATP, homólogo 1 (bacteriano)
polipéptido C de polimerasa I (ARN)
proteína 5 asociada a espermatogénesis
peptidasa 18 específica de ubiquitina
proteína 8 específica placentaria
factor IIF de transcripción general, polipéptido 1
inhibidor de factor nuclear del intensificador génico del polipéptido cadena ligera kappa en células B, beta
proteína 6 de dedos PHD
homólogo de factor de transcripción de ARN polimerasa I RRN3 (levadura)
molécula de células T citotóxicas y reguladoras
homólogo de COP9 (fotomorfogénica constitutiva), subunidad 6 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )
proteína 3 de glucosilación unida a asparagina (alfa-1,3-manosiltransferasa)
triptofanil-ARNt sintetasa
proteína 1 regulada positivamente por hipoxia
familia con similitud de secuencia 60, miembro A
antígeno celular estromal 2 de médula ósea
factor nuclear del intensificador génico del polipéptido cadena ligera kappa en células B, p49/p100

UTP20, componente de procesoma de subunidad pequeña (SSU, por sus siglas en inglés), homólogo (levadura)
antígeno CD274
sitio 1 de integración provírica
transductor de señales y activador de la transcripción 5A
antígeno CD69
pitrilisina metalopeptidasa 1
quinasa 6 dependiente de ciclina
polipéptido de caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 27
polipéptido B de polimerasa I (ARN)
factor de necrosis tumoral, proteína 3 alfa-inducida
modulador nodal 1
proteína nucleolar NOP14
proteína 1 similar a proteína ribosómica L7
metionil aminopeptidasa 1
factor 1 inducible por hipoxia, subunidad alfa
quinasa Janus 2
factor nuclear del intensificador génico del polipéptido cadena ligera kappa en células B, p105
oncogén de reticuloendoteliosis
septina 2
proteína nucleolar de interacción con el dominio FHA de MKI67
proteína 2 que contiene factor de elongación Tu dominio de unión a GTP
oncogén de mielocitomatosis
proteína 1 de disqueratosis congénita, diskarina
proteína 3 de gen asociado a deficiencia de carnitina expresado en ventrículo
proteína 4 de unión a GTP
proteína 1 que contiene HEAT
subunidad 3 activadora del proteasoma (prosoma, macropaína) (PA28 gamma, Ki)
miembro 1 de la familia de dominios de ribonucleoproteína La
segmento de ADN, Crom. 19, Brigham & Women's Genetics 1357
factor 3 de inicio de traducción eucariótico, subunidad D
acumulación de ARNr 20S TSR1
proteína de unión MYB (P160) 1a
proteína activadora de GTPasa Rho de activación de células T
RAB8B, miembro de la familia del oncogén RAS
polipéptido de caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 21
Tcp1 que contiene chaperonina, subunidad 4 (delta)
proteína 2 que contiene dominio hélice arrollada-hélice arrollada-hélice
proteína 43 de dominio de repetición WD

Puede prepararse UCART22 utilizando un vector VAA, preferentemente el vector VAA6 y todavía más preferentemente el vector VAA6/2, para la inserción del CAR CD22 u otro gen tal como se da a conocer en la presente memoria. El vector o vectores VAA pueden utilizarse tras la edición génica de un gen tal como el gen TRAC (gen codificante de la subunidad alfa o el TCR) o cualquier gen dado a conocer en el documento n.º PCT/EP2017/076798, utilizando una endonucleasa específica.

La transferencia celular adoptiva es la transferencia de células a un paciente. Las células pueden haberse originado en el paciente mismo y después haberse alterado antes de su transferencia de vuelta (transferencia singénica), o pueden proceder de otro individuo. Las células se derivan más habitualmente del sistema inmunitario, con el objetivo de transferir una funcionalidad y características inmunitarias mejoradas junto con las células de vuelta en el paciente. La transferencia de células autólogas, o células del paciente, minimiza la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) o el rechazo de tejidos u órganos. De manera similar, la transferencia de células T deficientes en TCR con CART CD22 minimiza la EICH. La transferencia de células CART CD22 deficientes en TCR y CHMI, minimiza la EICH y la enfermedad del huésped contra el injerto (EHCI).

En un caso, la etapa de modificación génica (ingeniería) de dichas células T tiene lugar antes de la etapa de introducción de los polinucleótidos o vectores codificantes de uno de los CAR CD22 en dichas células. Según un primer aspecto, puede conseguirse que la célula T sea menos alogénica, por ejemplo mediante inactivación de por lo menos un gen expresante de uno o más componentes del receptor de células T (TCR) tal como se describe en el documento n.º WO 2013/176915, que puede combinarse con la inactivación de un gen codificante o que regula la expresión de HLA, tal como el gen  $\beta 2m$  tal como se describe en el documento n.º WO2008102199 o en el documento n.º WO2015136001 o en el documento n.º WO2016201047. De acuerdo con lo anterior, el riesgo de síndrome de injerto contra el huésped y el riesgo de rechazo del injerto se reducen significativamente.

Según otro aspecto, las células T de la invención pueden modificarse genéticamente adicionalmente para mejorar la resistencia de las células T modificadas a un fármaco inmunosupresor o al tratamiento quimioterapéutico, que se utilizan como cuidado estándar para el tratamiento de las células malignas positivas para CD22 tal como se da a conocer en el documento n.º WO201575195.

#### *Resistencia al Campath (alemtuzumab)*

En un caso preferente, los genes que pueden inactivarse para proporcionar resistencia a fármaco a la célula T es un receptor de glucocorticoide (RG) y CD52. Los genes son inactivados para conseguir que las células sean resistentes a dichos tratamientos y para proporcionarles una ventaja competitiva sobre las propias células T del paciente no dotadas de CAR CD22 específicos.

La inactivación de CD52 y el gen TRAC en la célula T modificada según la invención se lleva a cabo utilizando una nucleasa TALEN o un sistema CRISPR CAS9.

En un caso más preferente, el gen que puede inactivarse para conferir resistencia a fármaco a las células T es CD52 en las células T inmunitarias TCR KO dotadas de un CAR CD22.

En un caso preferente, el gen que puede inactivarse para proporcionar resistencia a fármaco a la célula T es un receptor de glucocorticoide (RG).

La expresión del gen CD3 también puede suprimirse o reducirse para conferir resistencia al teplizumab, que es otro fármaco inmunosupresor. La expresión de HPRT también puede suprimirse o reducirse según la invención para conferir resistencia a la 6-tioguanina, un agente citostático utilizado habitualmente en la quimioterapia, especialmente para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda.

#### *Resistencia a análogos de nucleótido purina mediante delección del gen de desoxicitidina quinasa (dCK) humano*

En un caso preferente, el gen que puede inactivarse para conferir resistencia a fármaco a la célula T es el gen desoxicitidina quinasa (dCK) humano. Dicho enzima resulta necesario para la fosforilación de los desoxirribonucleósidos desoxicitidina (dC), desoxiguanosina (dG) y desoxiadenosina (dA). Los análogos de nucleótido purina (ANP) son metabolizados por la dCK en ANP mono-, di- y trifosfato. Sus formas trifosfato y particularmente la clofarabina trifosfato, compiten con el ATP en la síntesis del ADN, actúan como agente proapoptótico y son inhibidores potentes de la ribonucleótido reductasa (RNR), que participa en la producción de trinucleótidos.

La inactivación del gen dCK en la célula T modificada según la invención está mediada por una nucleasa TALE o el sistema CRISPR CAS9. Para conseguir dicha meta, se han diseñado varios pares de nucleasa TALE dCK, ensamblados al nivel polinucleótido y validados mediante secuenciación. Los ejemplos de parejas de TALE-nucleasa que pueden utilizarse se ilustran en el documento n.º PCT/EP2014/075317.

Esta inactivación de dCK en las células inmunitarias modificadas de la invención confiere resistencia a los análogos de nucleósido purina (los ANP), tales como la clofarabina y la fludarabina.

En otro caso preferente, la inactivación de dCK en las células inmunitarias modificadas de la invención se combina con una inactivación de los genes TRAC que convierte a estas células con doble inactivación (en inglés, «knock-out», KO) (TCR o TRAC KO y dCK KO) tanto resistentes a fármacos tales como la clofarabina, como menos alogénicas.

En otro caso preferente, la inactivación de CD52 en las células T modificadas de la invención se combina con una inactivación del gen TRAC que convierte a estas células con doble inactivación (KO) (TCR o TRAC KO y CD52 KO) tanto resistentes a fármacos tales como la Campath (alemtuzumab), como menos alogénicas.

Esta doble característica resulta particularmente útil para el objetivo terapéutico, proporcionando células alogénicas «inmediatamente disponibles» (UCART22) para la inmunoterapia junto con quimioterapia para el tratamiento de pacientes con cáncer que las necesitan. Dicha doble inactivación KO, dCK/TRAC o CD52/TRAC, puede llevarse a cabo simultánea o secuencialmente. Se describe un ejemplo de parejas de dCK/TRAC de nucleasa TALE que ha tenido éxito en la invención, en el documento n.º PCT/EP2014/075317, en particular, las secuencias diana en los 2 loci (dCK y TRAC). Documento n.º PCT/EP2014/075317.

La presente invención proporciona células T primarias que expresan un CDR CD22 de SEC ID n.º 15, en el que los genes CD52 y TRAC resultan inactivados por delección, para su utilización en el tratamiento de la LLC, la LLA, preferentemente sus formas agresivas, recidivantes-refractarias, opcionalmente en pacientes con linfodepleción, más preferentemente en formas recidivantes-refractarias de LLA-B.

Según un aspecto adicional, las células T pueden manipularse adicionalmente para que sean más activas o para limitar el agotamiento, mediante la inactivación de genes codificantes de proteínas que actúan como «puntos de control

inmunitario» que actúan como reguladores de la activación de las células T, tales como PDCD1 o CTLA-4. Se indican en la Tabla 9 ejemplos de genes, cuya expresión podría reducirse o suprimirse.

La presente invención proporciona, además, células T primarias que expresan un CAR CD22 de SEC ID n.º 15, en la que los genes CD52, TRAC y dCK han sido delecionados.

La presente invención proporciona, además, células T primarias que expresan un CAR CD22 de SEC ID n.º 15, en el que los genes CD52, TRAC y dCK han sido delecionados y se han insertado secuencias de HIF-1a para hacer las células resistentes a la hipoxia.

#### *Células modificadas resistentes a hipoxia*

En casos particulares, la expresión y actividad citolítica de la célula T CAR CD22 de la invención se mantienen, o se induce la expresión de la célula T CAR CD33 y se mantiene la actividad bajo condiciones de baja concentración de oxígeno (hipoxia) (en comparación con las condiciones normales de oxígeno: 20 % de O<sub>2</sub> frente a 1 % a 5 % de O<sub>2</sub>) y dichas células siguen dirigiéndose y destruyendo células tumorales cuando se encuentran incluidas en tejidos.

Se han descrito ejemplos de CAR inducible por hipoxia en células T (en el documento n.º WO2013123061 o en Juillerat, A. et al. An oxygen sensitive self-decision making engineered CAR T-cell Sci. Rep. 7, 39833; doi: 10.1038/srep39833 (2017)): Se ha construido un promotor sintético específico para OxiTF que controla la expresión del CAR CD22. Se ha diseñado OxiTF para activar un elemento genético sintético codificante de un CAR CD22. Tras encontrarse con el tumor, (creando hipoxia), las células T modificadas pueden «detectar» una reducción del nivel de oxígeno (en comparación con el nivel medio de O<sub>2</sub> en la sangre) e inducir la expresión del CAR CD22. La exposición en la superficie celular de CAR CD22 permite el reconocimiento del antígeno tumoral bajo hipoxia que finalmente inducirá la activación y proliferación de las células T mediante los dominios de activación y coestimulación presentes dentro de dicho CAR CD22. En última instancia, las células expresantes de antígeno tumoral son lisadas por el UCART22 de la invención.

Las células T también pueden modificarse para mantener su eficiencia en condiciones de baja concentración de O<sub>2</sub> (es decir, 1 % a 5 %) mediante la sobreexpresión de por lo menos uno, preferentemente todos, los factores siguientes: Oct3, Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc, o mediante la edición de un factor HIF-1a.

En la presente invención, se construyeron y sometieron a ensayo con éxito una célula modificada expresante de CAR de una sola cadena de CD22 sensible al oxígeno y una célula modificada expresante de CAR CD22 resistente a hipoxia.

Debido a que CD22 se expresa principalmente en las neoplasias malignas de células B expresantes de CD22, las cuales son «tumores líquidos» y por lo tanto se supone que no crean hipoxia, en contraste con los tumores sólidos, no se esperaba que las células T modificadas CAR CD22 resistentes a hipoxia fuesen más eficientes que las células inmunitarias modificadas CAR CD22, las cuales no son resistentes a hipoxia, contra LLA-B en el paciente. De hecho, el UCART22 de la invención que alcanza las células cancerosas anidadas, agregadas o atraídas por tejidos, podría ser capaz de lisar estas células.

Pueden editarse otros genes en el UCART22 de la presente invención, tales como los enumerados en la Tabla 5, a continuación.

Tabla 5: lista de genes codificantes de proteínas de punto de control inmunitario que pueden inactivarse según la presente invención en las células T modificadas CAR CD22 de la invención.

Ruta		Genes que pueden ser inactivados en la ruta
Receptores coinhibidores	CTLA4 (CD152)	CTLA4, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22
	PDCD1 (PD-1, CD279)	PDCD1
	CD223 (lag3)	LAG 3
	HAVCR2 (tim3)	HAVCR2
	BTLA(cd272)	BTLA
	CD160(by55)	CD160
	Familia de IgSF	TIGIT
		CD96
		CRTAM
	LAIR1(cd305)	LAIR1
	SIGLECs	SIGLEC7
		SIGLEC9
	CD244(2b4)	CD244

(continuación)

Ruta		Genes que pueden ser inactivados en la ruta
Receptores de muerte	TRAIL	TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7
	FAS	FADD, FAS
Señalización de citoquinas	Señalización de TGF-beta	TGFBRII, TGFBRI, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1
	Señalización de IL10	IL10RA, IL10RB, HMOX2
	Señalización de IL6	IL6R, IL6ST
Bloqueo de la señalización de TCR		CSK, PAG1
		SIT1
T <sub>reg</sub> inducidas	T <sub>reg</sub> inducidas	FOXP3
Factores de transcripción que controlan el agotamiento	Factores de transcripción que controlan el agotamiento	PRDM1 (=blimp1, los ratones heterocigóticos controlan la infección vírica crónica mejor que los wt o los KO condicionales)
		BATF
Tolerancia mediada por hipoxia	Guanilato ciclasa inducida por iNOS	GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, GUCY1B3

La presente invención proporciona células T inmunitarias modificadas aisladas que expresan un CAR CD22 de SEC ID n.º 15, en el que los genes dCK y/o CD52 y TRAC son editados, es decir, inactivados por delección, para su utilización en el tratamiento de la LLC y la LLA, preferentemente sus formas agresivas, recidivantes-refractarias, opcionalmente en pacientes con linfodepleción.

La presente invención proporciona células T inmunitarias modificadas aisladas que expresan un CAR CD22 de SEC ID n.º 15, en el que los genes b2m y TRAC son editados, es decir, inactivados por delección, para su utilización en el tratamiento de la LLC y la LLA, preferentemente sus formas agresivas, recidivantes-refractarias, opcionalmente en pacientes con linfodepleción.

La presente invención proporciona células T inmunitarias modificadas aisladas que expresan un CAR CD22 de SEC ID n.º 15, en el que los genes TRAC e IL-10R son editados, es decir, inactivados por delección, para su utilización en el tratamiento de la LLC y la LLA, preferentemente sus formas agresivas, recidivantes-refractarias, en pacientes con linfodepleción. La presente invención proporciona células T inmunitarias modificadas que expresan un CAR CD22 (UCART22) que comprende un gen de TCR-alfa deficiente (de manera que la expresión en la superficie celular del TCR esté comprometida), un gen B2M deficiente (de manera que la expresión de las moléculas de CHM de clase I en la superficie celular esté comprometida) y además un gen KO de receptor de TGF-beta.

La presente invención proporciona células T inmunitarias modificadas que expresan un CAR CD22 (UCART22) que comprende un gen de TCR alfa deficiente (de manera que la expresión en superficie celular del TCR está comprometida), un gen B2M deficiente (de manera que la expresión de moléculas de CHM de clase I en la superficie celular está comprometida) y, además, un gen inactivado de receptor de IL-10.

La presente invención proporciona células T inmunitarias modificadas que expresan un CAR CD22 (UCART22) que comprende un gen de TCR-alfa deficiente (de manera que la expresión en superficie celular del TCR está comprometida), un gen B2M deficiente (de manera que la expresión de moléculas de CHM de clase I en la superficie celular está comprometida) y, además, un gen AHR KO.

La presente invención proporciona células T inmunitarias modificadas que expresan un CAR CD22 (UCART22) que comprende un gen de TCR-alfa deficiente (de manera que la expresión en superficie celular del TCR está comprometida), un gen B2M deficiente (de manera que la expresión de moléculas de CHM de clase I en la superficie celular está comprometida) y, además, un gen PD1 KO.

La presente invención proporciona células T inmunitarias modificadas que expresan un CAR CD22 (UCART22) que comprende un gen de TCR-alfa deficiente (de manera que la expresión en superficie celular del TCR está comprometida), un gen B2M deficiente (de manera que la expresión de moléculas de CHM de clase I en la superficie celular está comprometida) y, además, un gen LAG-3 KO.

La presente invención proporciona células T inmunitarias modificadas que expresan un CAR CD22 (UCART22) que comprende un gen de TCR-alfa deficiente (de manera que la expresión en superficie celular del TCR está comprometida), un gen B2M deficiente (de manera que la expresión de moléculas de CHM de clase I en la superficie celular está comprometida) y, además, un gen TIM-3 KO.

La presente invención proporciona células T inmunitarias modificadas aisladas que expresan un CAR CD22 de SEC



ID n.º 15, en las que los genes de CD52 y TRAC están inactivados por delección, para su utilización en el tratamiento de formas recidivantes-refractarias de LLA-B en pacientes con linfodepleción.

Preferentemente, un método de modificación de las células T implica introducir polinucleótidos en dichas células T, en particular ARNm codificantes de una endonucleasa específica de cortes raros para inactivar selectivamente los genes, tal como se ha mencionado anteriormente, mediante corte del ADN.

En un caso más preferente, dichas endonucleasas de corte raro son nucleasas TALE o endonucleasa Cas9. Las nucleasas TAL hasta el momento han demostrado una mayor especificidad y eficiencia de corte que los demás tipos de endonucleasas de corte raro, convirtiéndolas en las endonucleasas de elección y preferentes para producir las células inmunitarias modificadas a gran escala con una producción constante.

#### *Métodos de administración*

Los diferentes métodos descritos anteriormente implican introducir un CAR CD22 utilizado según la invención en una célula. A modo de ejemplos no limitativos, dicho CAR CD22 puede introducirse en forma de un transgén codificado por un vector plásmido de la invención. Dicho vector plásmido codificante de un CAR CD22 utilizado según la invención también puede contener un marcador de selección que proporciona la identificación y/o selección de células que han recibido dicho vector.

Se ha descrito en otro sitio un método que permite introducir un CAR CD22 utilizado según la invención y después expresarse en una célula inmunitaria aislada, por ejemplo en el documento n.º WO2013126720 o en el documento n.º WO2015121454.

Los polipéptidos correspondientes al CAR CD22 utilizado según la invención pueden sintetizarse in situ en la célula como resultado de la introducción de polinucleótidos codificantes de dichos polipéptidos en la célula. Alternativamente, dichos polipéptidos podrían producirse fuera de la célula y después introducirse en la misma. Los métodos para introducir un constructo polinucleótido en células son conocidos de la técnica e incluyen, como ejemplos no limitativos, métodos de transformación estable en los que el constructo polinucleótido se integra en el genoma de la célula; métodos de transformación transitoria en los que el constructo polinucleótido no se integra en el genoma de la célula y métodos mediados por virus. Dichos polinucleótidos pueden introducirse en la célula mediante, por ejemplo, vectores víricos recombinantes (p. ej., retrovirus, tales como lentivirus, adenovirus, virus adenoasociados), liposomas y similares. Por ejemplo, entre los métodos de transformación transitoria se incluyen, por ejemplo, microinyección, electroporación o bombardeo con partículas. Dichos polinucleótidos pueden incluirse en vectores, más particularmente plásmidos o virus, en vista de que se expresan en las células.

En una realización preferente, dicho polinucleótido codificante de un CAR CD22 se inserta en un vector VAA6 y se introduce en un gen dado. Los métodos para preparar un vector que permite la introducción del CAR CD22 de la invención y después su expresión en una célula T aislada han sido descritos en otro sitio, por ejemplo en el documento n.º WO2013126720.

#### *Células inmunitarias modificadas (UCART)*

Otro objetivo de la presente invención es una célula T modificada que está dotada de un CAR CD22 (UCART22) según se define en las reivindicaciones.

Preferentemente, dichas células T son células T aisladas, más preferentemente células T primarias aisladas.

El receptor UCART22 se proporciona en forma de un medicamento; de esta manera, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de UCART22 en forma de un medicamento.

Una «célula inmunitaria primaria» se refiere a una «célula originada en un tejido, tal como una muestra de sangre o de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés)» y que puede cultivarse en unos cuantos pases, y finalmente congelarse antes del uso; dicha célula inmunitaria primaria presenta una capacidad de división limitada (Raulf-Heimsoth M. T cell - primary culture from peripheral blood. *Methods Mol. Med.* 2008;138:17-30. doi: 10.1007/978-1-59745-366-0) en comparación con una célula transformada o cancerosa.

De acuerdo con lo anterior, una célula T modificada según la invención aislada a partir de una muestra de sangre, es una célula primaria y se ha derivado de una célula T inmunitaria seleccionada de entre linfocitos T inflamatorios, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T reguladores o linfocitos T ayudantes, células T asesinas naturales, preferentemente de linfocitos T citotóxicos, y se modifica adicionalmente.

«Modificada» significa que las células T primarias son modificadas de manera que estén dotadas de un CAR CD22 y en las que se edita por lo menos un gen; preferentemente dichas células se modifican de manera que estén dotadas de un CAR CD22 y no expresarán un TCR ni morirán en la presencia de análogos de nucleótido purina.

En otras palabras, las células T modificadas se refieren a células T inmunitarias aisladas TCR KO que comprenden por lo menos otro gen editado, que expresan CAR CD22.

En una realización particular, «modificado» significa que las células T primarias han sido modificadas de manera que estén dotadas de un CAR CD22; preferentemente, dichas células han sido modificadas de manera que estén dotadas de un CAR CD22 y no morirán en la presencia de análogos de nucleótido purina 1 a 5 micromol/l) o en la presencia de alemtuzumab (50 microgramos/ml). Valton et al., Molecular Therapy vol. 23 no. 9, 1507-1518 sep. 2015)

Preferentemente, dichas células T están dotadas de un CAR CD22 de SEC ID n.º 15.

Más preferentemente, dichas células T están dotadas de un CAR CD22 de SEC ID n.º 15 y comprenden por lo menos una secuencia SEC ID n.º 22.

Más preferentemente, dichas células T están dotadas de un CAR CD22 de SEC ID n.º 15 y comprenden por lo menos una secuencia SEC ID n.º 22 y por lo menos parte de la secuencia.

La presente invención proporciona una célula T inmunitaria primaria que expresa un CAR CD22 de la invención y que muestra una actividad de linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés) y/o de degranulación hacia las células expresantes de CD22.

La presente invención proporciona, además, una célula T primaria expresante de un CAR CD22 de la invención para el lisado de células expresantes de CD22, en particular células cancerosas expresantes de CD22.

Preferentemente, las células dirigidas por células T dotadas de un CAR CD22 de SEC ID n.º 15 de la invención son eficientes en el tratamiento de la LLA o LLC recidivante/refractaria/agresiva, preferentemente.

La presente invención utiliza, además, células o líneas celulares aisladas susceptibles de ser obtenidas mediante dicho método de modificación celular. En particular, dichas células aisladas comprenden por lo menos un CAR CD22 tal como se ha indicado anteriormente. En otra realización, dichas células aisladas comprenden una población de CAR, comprendiendo cada una diferentes dominios de unión a ligando extracelulares. En particular, dichas células aisladas comprenden una secuencia polinucleótido exógena codificante de CAR. Las células inmunitarias modificadas genéticamente de la presente invención resultan activadas y pueden proliferar independientemente de los mecanismos de unión a antígeno.

En el alcance de la presente invención también se encuentran comprendidas las células T inmunitarias aisladas (células T), más preferentemente células T inmunitarias aisladas modificadas según cualquiera de los métodos anteriormente descritos. Dichas células T inmunitarias se refieren a células de origen hematopoyético funcionalmente implicadas en el inicio y/o ejecución de una respuesta inmunitaria innata y/o adaptativa. Dichas células T inmunitarias según la presente invención pueden derivarse de células madre. Las células madre pueden ser células madre adultas, células madre embrionarias no humanas, más particularmente células madre no humanas, células madre sanguíneas del cordón, células progenitoras, células madre de la médula ósea, células madre pluripotentes inducidas o células madre hematopoyéticas. Las células humanas representativas con células CD34<sup>+</sup>. Dichas células aisladas pueden ser células T seleccionadas del grupo que consiste en linfocitos T inflamatorios, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T reguladores o linfocitos T ayudantes. En otra realización, dichas células pueden derivarse del grupo que consiste en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

Antes de la expansión y modificación genética de las células de la invención, puede obtenerse una fuente de células a partir de un sujeto mediante una variedad de métodos no limitativos. Pueden obtenerse células a partir de varias fuentes no limitativas, incluyendo células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglio linfático, sangre del cordón, tejido tímico, tejido, ascites, efusión pleural, tejido de bazo y tumores. En determinadas realizaciones de la presente invención, puede utilizarse cualquier número de líneas de células T disponibles y conocidas por el experto en la materia. En otra realización, dicha célula puede derivarse de un donante sano, de un paciente diagnosticado con cáncer o de un paciente diagnosticado con una infección. En otra realización, dicha célula es parte de una población mixta de células que presenta diferentes características fenotípicas. En el alcance de la presente invención también está comprendida una línea celular obtenida de una célula T modificada según el método descrito. Las células modificadas resistentes a un tratamiento inmunosupresor y susceptibles de obtenerse mediante el método anterior están comprendidas dentro del alcance de la presente invención.

Como realización preferente, la presente invención proporciona células T o una población de células T dotadas de un CAR CD22 tal como se ha indicado anteriormente, que no expresan TCR funcional y que son reactivas con las células positivas para CD22, para su transferencia adoptiva en pacientes.

Como realización más preferente, la presente invención proporciona células T o una población de células T dotada de un CAR CD22 tal como se ha indicado anteriormente, que no expresan TCR funcional y que se han hecho resistentes a la quimioterapia, en particular a los análogos de nucleótido purina (los ANP).

Según una realización preferente de la invención, las células T dotadas de un CAR CD22 han sido modificadas para ser resistentes a los fármacos quimioterapéuticos, en particular los análogos de nucleótido purina (ANP), haciendo que sean adecuadas para el tratamiento del cáncer que combinan la inmunoterapia adoptiva y la quimioterapia.

Los análogos de nucleótido purina forman parte de composiciones quimioterapéuticas para el tratamiento de muchos cánceres. Se utilizan como tratamiento de referencia contra la leucemia o el linfoma. Los ANP utilizados más ampliamente son la clofarabina, la fludarabina y la citarabina, solas o en combinación. Los ANP son metabolizados por enzimas que presentan actividad de desoxicitidina quinasa (dCK) [EC 2.7.1.74] en ANP mono-, di- y trifosfato. Sus formas trifosfato y particularmente la clofarabina trifosfato, compiten con el ATP en la síntesis del ADN, actúan como agente proapoptótico y son inhibidores potentes de la ribonucleótido reductasa (RNR), que participa en la producción de trinucleótidos.

Se da a conocer un método de producción de células T primarias *ex vivo* que no expresan TCR, que son resistentes a un fármaco de análogo de purina y que pueden presentar como diana las células malignas positivas para CD22.

Un método de preparación de un UCART22 según la invención también puede ser el dado a conocer en el documento n.º WO 2013176915 o en el documento n.º WO 2014191128.

Un método para producir un UCART22 que comprende las etapas siguientes:

(a) proporcionar células T aisladas o una población aislada de células T de un donante,  
(b) introducir en dicha célula o células T (preferentemente mediante transfección o transducción) una secuencia de ácido nucleico codificante de una endonucleasa de corte raro con diana específicamente en:

- un gen expresante de un enzima que presenta actividad de desoxicitidina quinasa (dCK, EC 2.7.1.74), en particular el gen de desoxicitidina quinasa humana (NCBI, ID génico: 1633) y/o
- un gen codificante de la subunidad alfa y/o beta de TCR, preferentemente alfa, y/o
- un gen codificante de CD52 humano,

(c) expresar dicha endonucleasa en dicha célula o células T para obtener una inactivación dirigida de dicho gen o genes,

(d) expandir la célula o células T modificadas que se han obtenido en la etapa c), opcionalmente en la presencia de un fármaco análogo de purina,

(e) introducir en dicha célula o células T, un CAR CD22 tal como se ha indicado anteriormente, preferentemente de SEC ID n.º 15.

Un método para producir un UCART22 que comprende las etapas siguientes:

(a) proporcionar células T aisladas o una población aislada de células T de un donante,  
(b) introducir en dicha célula o células T (preferentemente mediante transfección o transducción) una secuencia de ácido nucleico codificante de una endonucleasa de corte raro con diana específicamente en:

- un gen expresante de un enzima que presenta actividad de desoxicitidina quinasa (dCK, EC 2.7.1.74), en particular el gen de desoxicitidina quinasa humana (NCBI, ID génico: 1633) y/o
- un gen codificante de la subunidad alfa y/o beta de TCR, preferentemente alfa, y/o
- un gen codificante de microglobulina beta-2 (B2M),

(c) expresar dicha endonucleasa en dicha célula o células T para obtener una inactivación dirigida de dicho gen o genes,

(d) expandir la célula o células T modificadas que se han obtenido en la etapa c), opcionalmente en la presencia de un fármaco análogo de purina,

(e) introducir en dicha célula o células T un CAR CD22 tal como se ha indicado anteriormente, solo o en combinación con un CAR CD19, todavía más preferentemente un CAR CD22 de SEC ID n.º 15, solo o en combinación con un CAR CD19.

Preferentemente, se da a conocer un método de producción de células T primarias *ex vivo* que no expresan TCR, que son resistentes a un fármaco de análogo de purina y que pueden presentar como diana las células malignas positivas para CD22. Dicho método comprende las etapas siguientes:

- proporcionar células T aisladas (o una población aislada de células T) de un donante,
- introducir en dicha célula o células T, un CAR CD22 tal como se ha indicado anteriormente, preferentemente de SEC ID seleccionada de SEC ID n.º 15.
- Expandir la célula o células T modificadas obtenidas en la etapa b),

- (d) introducir en dicha célula o células T (mediante transfección o transducción) una secuencia de ácido nucleico codificante de una endonucleasa de corte raro con diana específicamente en un gen expresante de un enzima que presenta actividad de desoxicitidina quinasa (dCK, EC 2.7.1.74), en particular el gen de desoxicitidina quinasa humana (NCBI, ID génico: 1633) y/o un gen que expresa una de la subunidad alfa o beta de TCR,
- (e) expresar dicha endonucleasa en dicha célula o células T para obtener una inactivación dirigida de dicho gen o genes,
- (f) expandir la célula o células T modificadas que se han obtenido en la etapa e), opcionalmente en la presencia de un fármaco análogo de purina.

El método de producción de células T primarias *ex vivo* que no expresan TCR, que son resistentes a un fármaco análogo de purina que pueden presentar como diana células malignas positivas para CD22, opcionalmente comprende otra etapa de introducción en dichas células T (mediante transfección o transducción) una secuencia de ácido nucleico codificante de una endonucleasa de corte raro con diana específicamente uno de los genes citados en la Tabla 9, preferentemente PD-1, CD279 y más preferentemente PDCD1 (PD1, CD279) o CTLA4 (CD152).

Los presentes inventores han creado con éxito células T primarias expresantes de CAR CD22 resistentes a análogos de nucleótido purina (dCK-KO), más particularmente a clorofarabina y/o fludarabina, mediante medicación de la inactivación (deleción) de la expresión génica de dCK en dichas células, particularmente mediante la utilización de nucleasas, en particular nucleasas TAL.

La transfección de las células T utilizando ARNm codificante de una nucleasa TAL específica dirigida contra genes dCK, preferentemente mediante la utilización de la electroporación tal como se describe en el documento n.º WO2013176915, indujo una resistencia significativa a los fármacos, manteniendo simultáneamente la actividad de las células T citotóxicas contra las células portadoras de CD22.

La presente solicitud proporciona, además, células T primarias CAR CD22 TCR-KO (preferentemente de SEC ID n.º 15), cuya expresión de desoxicitidina quinasa ha sido reprimida o inactivada (dCK-KO) para el tratamiento de la leucemia o el linfoma, preferentemente de su forma agresiva, resistente y recidivante, más preferentemente LLA-B.

Según una realización preferente de la invención, las células T dotadas de un CAR CD22 han sido modificadas para ser resistentes a los fármacos quimioterapéuticos, en particular a alemtuzumab (Campath), haciendo que sean adecuadas para los tratamiento del cáncer, combinando inmunoterapia adoptiva y quimioterapia.

El alemtuzumab se utiliza para el tratamiento de muchos cánceres. Se utiliza como tratamiento de referencia contra la leucemia o el linfoma, en particular en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (LLC), el linfoma cutáneo de células T (LCCT) y el linfoma de células T. Es conocido bajo los nombres comerciales Campath, MabCampath y Campath-1H. También se utiliza en algunos regímenes de acondicionamiento para el trasplante de médula ósea, el trasplante renal y el trasplante de células de los islotes.

Es un anticuerpo monoclonal que se une a CD52, una proteína presente sobre la superficie de los linfocitos maduros, pero no sobre las células madre, a partir de las cuales se derivan dichos linfocitos. Tras el tratamiento con alemtuzumab, estos linfocitos portadores de CD52 son diana para su destrucción.

El alemtuzumab también se utiliza como tratamiento de segunda línea para la LLC. Ha sido aprobada por la US Food and Drug Administration para los pacientes de LLC que han sido tratados con agentes alquilantes y en los que ha fracasado el tratamiento de fludarabina.

De esta manera, se da a conocer un método de producción *ex vivo* de UCART22, que de esta manera no expresan TCR y que son resistentes al alemtuzumab.

Un método para preparar un UCART22 CD52 KO comprende las etapas siguientes:

- (a) proporcionar células T aisladas o una población aislada de células T de un donante,
- (b) introducir en dicha célula o células T (preferentemente mediante transfección o transducción) una secuencia de ácido nucleico codificante de una endonucleasa de corte raro con diana específicamente en
- un gen codificante de la subunidad alfa y/o beta de TCR, preferentemente alfa, y/o
  - un gen codificante de CD52,
- (c) expresar dicha endonucleasa en dicha célula o células T para obtener una inactivación dirigida de dicho gen o genes,
- (d) expandir la célula o células T modificadas que se han obtenido en la etapa c), opcionalmente en la presencia de alemtuzumab,
- (e) introducir en dicha célula o células T, un CAR CD22 tal como se ha indicado anteriormente, preferentemente de SEC ID n.º 15.

Preferentemente, se da a conocer un método de producción *ex vivo* de células T primarias que no expresan TCR, que son resistentes al alemtuzumab y que pueden presentar como diana las células malignas positivas para CD22. Dicho método comprende las etapas siguientes:

- proporcionar células T aisladas (o una población aislada de células T) de un donante,
- Introducir en dicha célula o células T, un CAR CD22 tal como se ha indicado anteriormente, preferentemente de SEC ID n.º 15.
- Expandir la célula o células T modificadas obtenidas en la etapa b),

(d) introducir en dicha célula o células T (mediante transfección o transducción) una secuencia de ácido nucleico codificante de una endonucleasa de corte raro con diana específicamente en un gen expresante de CD52 y en un gen expresante de una de las subunidades alfa y beta del TCR,

(e) expresar dicha endonucleasa en dicha célula o células T para obtener una inactivación dirigida de dicho gen o genes,

(f) expandir la célula o células T modificadas que se han obtenido en la etapa e), opcionalmente en la presencia de un fármaco análogo de purina.

En un caso, n método para producir un UCART22 comprende las etapas siguientes:

(a) proporcionar células T aisladas o una población aislada de células T de un donante,

(b) introducir en dicha célula o células T (preferentemente mediante transfección o transducción)

- una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una endonucleasa de corte raro con diana específicamente en un gen codificante de una de la subunidad alfa y/o beta de TCR, preferentemente la alfa, y
- un ácido nucleico codificante de una secuencia que va a insertarse, preferentemente codificante de HIF-1alfa,

(c) expresar dicha endonucleasa en dicha célula o células T para obtener una inserción dirigida de dicha secuencia que va a insertarse,

(d) expandir la célula o células T modificadas que se han obtenido en la etapa c), opcionalmente en la presencia de una baja concentración de O<sub>2</sub> (5 % de O<sub>2</sub>, preferentemente 1 % de O<sub>2</sub>),

(e) introducir en dicha célula o células T, un CAR CD22 tal como se ha indicado anteriormente, preferentemente de SEC ID n.º 15.

Preferentemente, se da a conocer un método de producción *ex vivo* de células T primarias que no expresan TCR, que son resistentes a hipoxia y que pueden presentar como diana las células malignas positivas para CD22. Dicho método comprende las etapas siguientes:

- proporcionar células T aisladas (o una población aislada de células T) de un donante,
- Introducir en dicha célula o células T, un CAR CD22 tal como se ha indicado anteriormente, preferentemente de SEC ID n.º 15,
- Expandir la célula o células T modificadas obtenidas en la etapa b),

(b) introducir en dicha célula o células T (preferentemente mediante transfección o transducción)

- una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una endonucleasa de corte raro con diana específicamente en un gen codificante de una de la subunidad alfa y/o beta de TCR, preferentemente la alfa, y
- un ácido nucleico codificante de una secuencia que va a insertarse codificante de HIF-1alfa,

(e) expresar dicha endonucleasa en dicha célula o células T para obtener una inserción dirigida de dicho gen o genes,

(f) expandir la célula o células T modificadas que se han obtenido en la etapa e), opcionalmente en la presencia de una baja concentración de O<sub>2</sub> (5 % de O<sub>2</sub>, preferentemente 1 % de O<sub>2</sub>).

El método de producción de células T primarias *ex vivo* que no expresan TCR, que son resistentes o bien a un fármaco análogo de purina, alemtuzumab o hipoxia y que pueden presentar como diana células malignas positivas para CD22, opcionalmente comprende otra etapa de introducción en dichas células T (mediante transfección o transducción) de una secuencia de ácido nucleico codificante de una endonucleasa de corte raro con diana específicamente uno de los genes citados en la Tabla 9, preferentemente (PD-1, CD279) y más preferentemente PDCD1 (PD1, CD279) o CTLA4 (CD152).

Los presentes inventores han creado con éxito células T primarias expresantes de CAR CD22 resistentes a análogos de nucleótido purina (dcK-KO), más particularmente a clorofarabina y/o fludarabina, mediante mediación en la

inactivación (deleción) de la expresión génica de dCK en dichas células, particularmente mediante la utilización de nucleasas, en particular nucleasas TAL.

La transfección de las células T utilizando ARNm codificante de una nucleasa TAL específica dirigida contra genes dCK, preferentemente mediante la utilización de la electroporación tal como se describe en el documento n.º WO2013176915, indujo una resistencia significativa a los fármacos, manteniendo simultáneamente la actividad de las células T citotóxicas contra las células portadoras de CD22.

Se aplica el mismo método a la deleción de CD52 humano utilizando una TALEN específica, tal como describen los presentes inventores.

La presente solicitud proporciona, además, células T primarias CAR CD22 TCR-KO (preferentemente de SEC ID n.º 15), cuya expresión de desoxicitidina quinasa ha sido reprimida o inactivada (dCK-KO) para el tratamiento de la leucemia o el linfoma, preferentemente de su forma agresiva, resistente y recidivante, más preferentemente LLA-B recidivante.

Dichas células son células T «universales» (o UCART).

En una realización, la presente solicitud proporciona células T primarias CAR CD22 (preferentemente de SEC ID n.º 15), cuya expresión de desoxicitidina quinasa ha sido reprimida o inactivada (dCK-KO) para el tratamiento de la leucemia o el linfoma, preferentemente de su forma agresiva, resistente y recidivante, más preferentemente LLA-B recidivante, tras la transferencia autóloga.

En una realización, la presente solicitud proporciona células T primarias CAR CD22 (preferentemente de SEC ID n.º 15), cuya expresión de CD52 ha sido reprimida o inactivada (CD52-KO) para el tratamiento de la leucemia o el linfoma, preferentemente de su forma agresiva, resistente y recidivante, más preferentemente LLA-B recidivante, tras la transferencia autóloga.

En una realización, la presente solicitud proporciona células T primarias CAR CD52 (preferentemente de SEC ID n.º 15), cuya expresión de HIF-1alfa se ha incrementado mediante inserción de la secuencia codificante en la secuencia TRAC sin desactivación de TCR para el tratamiento de la leucemia o el linfoma, preferentemente de su forma agresiva, resistente y recidivante; más preferentemente LLA-B recidivante tras la transferencia autóloga.

En una realización, la presente solicitud proporciona células T primarias CAR CD22 (preferentemente de SEC ID n.º 15), cuya expresión de desoxicitidina quinasa y CD52 ha sido reprimida o inactivada (dCK-KO y CD52-KO) para el tratamiento de la leucemia o el linfoma, preferentemente de su forma agresiva, resistente y recidivante, más preferentemente LLA-B recidivante, tras la transferencia autóloga.

En una realización, la presente solicitud proporciona células T primarias CAR CD22 (preferentemente de SEC ID n.º 15), cuya expresión de desoxicitidina quinasa y CD52 ha sido reprimida o inactivada (dCK-KO y CD52-KO) y cuya expresión de HIF-1alfa ha sido incrementada mediante la inserción de la secuencia codificante de HIF-1alfa en la secuencia de TRAC sin desactivación de TCR, para el tratamiento de la leucemia o el linfoma, preferentemente de su forma agresiva, resistente y recaída, más preferentemente LLA-B en recaída, tras la transferencia autóloga.

El método de producción de células T primarias *ex vivo* que no expresan TCR, que son resistentes a un fármaco análogo de purina y/o a alemtuzumab y/o a hipoxia y que pueden presentar como diana células malignas positivas para CD22, opcionalmente comprende otra etapa de introducción en dichas células T (mediante transfección o transducción) de una secuencia de ácido nucleico codificante de una endonucleasa de corte raro con diana específicamente uno de los genes citados en la Tabla 9, preferentemente PD-1 o CD279, y más preferentemente PDCD1 (PD1, CD279) o CTLA4 (CD152).

Los presentes inventores han creado con éxito células T primarias expresantes de CAR CD22 resistentes a análogos de nucleótido purina (dck-KO), más particularmente a clorofarabina y/o fludarabina, mediante mediación en la inactivación (deleción) de la expresión del gen dCK en dichas células, particularmente mediante la utilización de nucleasas, en particular nucleasas TAL.

Los presentes inventores han creado con éxito células T primarias expresantes de CAR CD22 resistentes a hipoxia, mediante una inserción dirigida del gen de HIF-1alfa en dichas células, particularmente mediante la utilización de nucleasas, en particular nucleasas TAL.

La transfección de las células T utilizando ARNm codificante de una nucleasa TAL específica dirigida contra genes dCK, preferentemente mediante la utilización de la electroporación tal como se describe en el documento n.º WO2013176915, indujo una resistencia significativa a los fármacos, manteniendo simultáneamente la actividad de las células T citotóxicas contra las células portadoras de CD22.

La presente solicitud proporciona, además, células T primarias CAR CD22 TCR-KO (preferentemente de SEC ID n.º

15), resistentes a hipoxia, para el tratamiento de la leucemia o el linfoma, preferentemente de su forma agresiva, resistente y recidivante, más preferentemente LLA-B.

#### Activación y expansión de células T

Ya sea antes o sea después de la modificación genética de las células T, aunque las células inmunitarias modificadas genéticamente de la presente invención estén activadas y proliferen independientemente de los mecanismos de unión a antígeno, las células inmunitarias, particularmente las células T de la presente invención, pueden activarse y expandirse adicionalmente en general utilizando los métodos descritos en, por ejemplo, las patentes US n.º 6.352.694, n.º 6.534.055, n.º 6.905.680, n.º 6.692.964, n.º 5.858.358, n.º 6.887.466, n.º 6.905.681, n.º 7.144.575, n.º 7.067.318, n.º 7.172.869, n.º 7.232.566, n.º 7.175.843, n.º 5.883.223, n.º 6.905.874, n.º 6.797.514, n.º 6.867.041 y la solicitud publicada de patente US n.º 20060121005. Las células T pueden expandirse *in vitro*.

Generalmente, las células T de la invención se expanden mediante contacto con un agente que estimula un complejo CD3-TCR y una molécula coestimuladora sobre la superficie de las células T para crear una señal de activación para las células T. Por ejemplo, pueden utilizarse compuestos químicos tales como el ionóforo de calcio A23187, 13-acetato de 12-miristato de forbol (PMA, por sus siglas en inglés), o lectinas mitogénicas como la fitohemaglutinina (PHA, por sus siglas en inglés), para crear una señal activación para las células T.

Como ejemplos no limitativos, las poblaciones de células T pueden estimularse *in vitro*, tal como mediante contacto con un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado sobre la superficie, o mediante contacto con un activador de proteína quinasa C (p. ej., briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la coestimulación de una molécula accesoria sobre la superficie de las células T, se utiliza un ligando que se une a la molécula accesoria. Por ejemplo, puede ponerse en contacto una población de células T con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, bajo condiciones adecuadas para estimular la proliferación de las células T. Entre las condiciones adecuadas para el cultivo de células T se incluyen un medio apropiado (p. ej., medio esencial mínimo o medio RPMI 1640, o X-vivo 5 (Lonza)) que puede contener factores necesarios para la proliferación y la viabilidad, incluyendo suero (p. ej., suero fetal bovino o humano), interleuquina-2 (IL-2), insulina, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-7, GM-CSF, -10, -2, IL-15, TGF $\beta$  y TNF $\alpha$ , o cualesquiera otros aditivos para el crecimiento de células conocidos por el experto en la materia. Entre otros aditivos para el crecimiento de células se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, surfactante, plasmanato y agentes reductores, tales como N-acetilcisteína y 2-mercaptoetanol. Entre los medios pueden incluirse RPMI 1640, A1M-V, DMEM, MEM,  $\alpha$ -MEM, F-12, X-Vivo 1 y X-Vivo 20, Optimizer, con adición de aminoácidos, piruvato sódico y vitaminas, sean sin suero o complementados con una cantidad adecuada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de una o más citoquinas suficiente para el crecimiento y expansión de las células T. Se incluyen antibióticos, p. ej., penicilina y estreptomycin, solo en los cultivos experimentales, no en cultivos de células que van a infundirse en un sujeto. Las células diana se mantienen bajo condiciones necesarias para permitir el crecimiento, por ejemplo, una temperatura apropiada (p. ej., 37 °C) y una atmósfera adecuada (p. ej., aire más 5 % de CO<sub>2</sub>). Las células T que han sido expuestas a tiempos de estimulación variados pueden mostrar características diferentes.

En otra realización particular, dichas células pueden expandirse mediante el cocultivo con tejido o células.

#### Composición farmacéutica

Otro objetivo de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende una célula T inmunitaria modificada de la invención (preferentemente expresante de un CAR de SEC ID n.º 15) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el receptor UCART22 de la presente invención (como cualquiera de las realizaciones anteriores) con un compuesto de la familia de las briostatinas, preferentemente briostatina-1.

Las briostatinas son un grupo de lactonas macrólidas del briozoo *Bugula neritina*. La estructura de la briostatina-1 fue determinada en la década de los 1980. Hasta ahora se han aislado 20 briostatinas diferentes; además, determinados análogos de briostatina se han denominado «briólogos». Las briostatinas son moduladores potentes de la proteína quinasa C (Wender, Paul A., Jeremy L. Baryza, Chad E. Bennett, F. Christopher Bi, Stacey E. Brenner, Michael O. Clarke, Joshua C. Horan, Cindy Kan, Emmanuel Lacôte, Blaise Lippa, Peter G. Nell y Tim M. Turner. The Practical Synthesis of a Novel and Highly Potent Analogue of Bryostatins. Journal of the American Chemical Society 2002 124 (46), 13648-13649 DOI: 10.1021/ja027509+) Se describen ejemplos de compuestos briostatina adecuados para la combinación con UCART22 de la invención y métodos de preparación de estos compuestos en el documento n.º WO2001040214A1 o en el documento n.º EP2737904A2, WO1997034598.

Un ejemplo de una dosis de briostatina-1 que puede utilizarse en combinación con el receptor UCART22 de la presente invención es tal como uno descrito anteriormente en Varterasian ML1, Mohammad RM, Shurafa MS, Hulburd K, Pemberton PA, Rodriguez DH, Spadoni V, Eilender DS, Murgo A, Wall N, Dan M, Al-Katib AM. Phase II trial of

bryostatin 1 in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. Clin. Cancer Res. 2000 Mar;6(3):825-8.

Se proporciona a modo de medicamento una célula T inmunitaria modificada (KO para TRAC y dCK o para TRAC y CD52) de la invención (preferentemente expresante de un CAR CD22 de SEC ID n.º 15) [un UCART22] o una composición farmacéutica que comprende dicho UCART22.

Otro objetivo de la presente invención es una célula T inmunitaria modificada (KO para TRAC y dCK o para TRAC y CD52) de la invención (preferentemente expresante de un CAR CD22 de SEC ID n.º 15) [un UCART22] para la utilización en el tratamiento del cáncer o para atenuar la inflamación.

Otro objetivo de la presente invención es una célula T inmunitaria modificada (KO para TRAC y dCK o para TRAC y CD52) de la invención (preferentemente expresante de un CAR CD22 de SEC ID n.º 15) [un UCART22] para la utilización en el tratamiento de LLA, LLC, formas agresivas recidivantes-refractarias de LLC o LLA.

Se proporciona una célula T inmunitaria modificada (KO para TRAC y dCK o para TRAC y CD52) de la invención (preferentemente expresante de un CAR CD22 de SEC ID n.º 15) [un UCART22] para la utilización en el tratamiento de un cáncer recidivante CD19, preferentemente una LLA-B recidivante CD19.

En otra realización, se proporciona a modo de medicamento una célula T inmunitaria modificada (KO para TRAC y dCK o para TRAC y CD52) resistente a hipoxia de la invención (preferentemente expresante de un CAR CD22 de SEC ID n.º 15) [un UCART22] o una composición farmacéutica que comprende dicho UCART22.

En otra realización, es otro objetivo de la presente invención una célula T inmunitaria modificada (KO para TRAC y dCK o para TRAC y CD52) resistente a hipoxia de la invención (preferentemente expresante de un CAR CD22 de SEC ID n.º 15) [un UCART22] para la utilización en el tratamiento de cáncer o para atenuar la inflamación.

En otra realización, es otro objetivo de la presente invención una célula T inmunitaria modificada (KO para TRAC y dCK o para TRAC y CD52) resistente a hipoxia de la invención (preferentemente expresante de un CAR CD22 de SEC ID n.º 15) [un UCART22] para la utilización en el tratamiento de LLA, LLC, formas agresivas recidivantes-refractarias de LLC o LLA.

En otra realización, se proporciona una célula T inmunitaria modificada (KO para TRAC y dCK o para TRAC y CD52) resistente a hipoxia de la invención (preferentemente expresante de un CAR CD22 de SEC ID n.º 15) [un UCART22] para la utilización en el tratamiento de un cáncer recidivante CD19, preferentemente una LLA-B recidivante CD19.

La célula aislada según la invención o la línea celular derivada de dicha célula aislada puede utilizarse en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer en un paciente que lo necesita. Dicho medicamento puede utilizarse para el tratamiento de cáncer, particularmente para el tratamiento de linfomas y leucemias de células B en un paciente que lo necesita. En otra realización

La presente invención comprende la transferencia autóloga de células modificadas. En ese caso, las células se aíslan de un donante, un donante humano, se modifican y después se transfieren al donante inicial que lo necesita.

En la presente realización particular, las células pueden modificarse para, por ejemplo, que sean resistentes a un fármaco, tal como alemtuzumab (Campath) y/o APN, y opcionalmente para que sean resistentes a la hipoxia.

#### *Aplicaciones terapéuticas*

El término «cáncer» se refiere a una enfermedad caracterizada por el crecimiento incontrolado de uno o varios tipos de células.

Se describen ejemplos de cáncer en la presente memoria y entre ellos se incluyen, aunque sin limitación, tumores líquidos o cáncer hemático.

Un cáncer hemático según la presente invención puede seleccionarse de entre linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, leucemia, mieloma múltiple, leucemia linfocítica B crónica, leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de Burkitt, cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, preferentemente un cáncer hemático expresante de CD22, más preferentemente un cáncer hemático expresante de CD22 recidivante o refractario, todavía más preferentemente una forma agresiva de dicho cáncer hemático relacionado con CD22.

En una realización preferente, un cáncer hemático expresante de CD22 recidivante o refractario es LLA-B expresante o positivo para CD22 recidivante y/o refractario.

De acuerdo con lo anterior, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de UCART22 según cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente o una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica tal



como se ha indicado anteriormente, para la utilización como una medicación para el tratamiento de un paciente que sufre de una LLA-B expresante o positiva para CD22 recidivante y/o refractaria.

En otra realización, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de UCART22 según cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente o una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica tal como se ha descrito anteriormente, para la utilización como una medicación para el tratamiento de un paciente que sufre de un cáncer hemático positivo para CD22 seleccionado de entre leucemia y linfoma leucemia de células pilosas, cualquiera de entre cáncer linfocítico agudo, leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica B crónica, cáncer mieloide crónico, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin y linfoma de Burkitt, y mieloma múltiple.

En otra realización, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de UCART22 según cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente o se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica tal como se ha descrito anteriormente para el tratamiento de un paciente en el que dicho paciente sufre de un cáncer positivo para CD22 seleccionado de rhabdomyosarcoma alveolar, cáncer de vejiga (p. ej., carcinoma de vejiga), cáncer óseo, cáncer cerebral (p. ej., meduloblastoma), cáncer de mama, cáncer del ano, canal anal o anorrecto, cáncer ocular, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de las articulaciones, cáncer del cuello, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de la pleura, cáncer de nariz, cáncer de la cavidad nasal, cáncer del oído medio, cáncer de la cavidad oral, cáncer de vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer esofágico, cáncer cervical, fibrosarcoma, tumor carcinoide gastrointestinal, cáncer de cabeza y cuello (p. ej., carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), cáncer de hipofaringe, cáncer renal, cáncer de laringe, cáncer hepático, cáncer pulmonar (p. ej., carcinoma pulmonar no microcítico), mesotelioma maligno, mastocitoma, melanoma, cáncer nasofaríngeo, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de peritoneo, cáncer de omento, cáncer mesentérico, cáncer de faringe, cáncer prostático, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer del intestino delgado, cáncer de tejidos blandos, tumores sólidos, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides y cáncer de uréter.

Se describen otros ejemplos de cánceres mediados por CD22 en la presente memoria y entre ellos se incluyen, aunque sin limitación, cáncer hepático, cáncer pulmonar (p. ej., carcinoma pulmonar no microcítico), cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de tiroides y cáncer urotelial.

En una realización particular, se proporciona el objetivo de la presente para el tratamiento de formas agresivas de dichos cánceres, definido como un crecimiento por lo menos 2 veces más rápido que la media general de crecimiento de dichos cánceres en la población.

En una realización, los objetivos de la presente invención son para la utilización en el tratamiento de la leucemia durante la etapa acelerada del tratamiento.

En una realización particular, se proporciona el objetivo de la presente invención para el tratamiento de linfoma difuso de células B grandes, refractario/recidivante no Hodgkin - metástasis de mama en el pulmón - cáncer triple consistente en leucemia linfocítica crónica con carcinoma de vejiga y próstata.

Preferentemente, el cáncer es una neoplasia maligna hemática (p. ej., leucemia o linfoma, incluyendo, aunque sin limitación, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica B crónica, leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica aguda (LLA9 y linfoma de Burkitt).

Más preferentemente, el cáncer se caracteriza por la expresión de CD22, más preferentemente, el cáncer se caracteriza por la expresión de CD22 por células cancerosas, todavía más preferentemente por la sobreexpresión de CD22 por células cancerosas.

En una realización, dichas células de cáncer son células de cáncer negativas para CD19 recidivante-refractario. En una realización, dichas células de cáncer son células de cáncer expresantes de CD19 recidivante-refractario.

En una realización preferente, dichas células de cáncer son células de LLA-B recidivante-refractario negativo para CD19 y positivo para CD22.

La LLA de células B comprende:

- LLA de B precursoras tempranas (pre-B tempranas) (también denominado LLA pro-B)
- LLA común
- LLA pre-B
- LLA de células B maduras, también llamada leucemia de Burkitt o linfoma no de Hodgkin en niños.

La expresión «enfermedad asociada a la expresión de CD22» tal como se utiliza en la presente memoria incluye, aunque sin limitación, una enfermedad asociada a la expresión de CD22 o una afección asociada a la actividad de

células que expresan CD22, incluyendo células tumorales de diversos cánceres, tales como, p. ej., un LLA-B expresante de CD22.

La destrucción celular por lisado es uno de los mecanismos por los que las células T CAR CD22 de la invención actúan contra las células expresantes de CD22, reduciendo o eliminando tumores, facilitando la infiltración de células inmunitarias de los huéspedes en el sitio tumoral, y potenciando/extendiendo las respuestas antitumorales.

Dicho tratamiento puede ser paliativo, curativo o profiláctico. Puede ser parte de una inmunoterapia autóloga o parte de un tratamiento inmunoterapéutico alogénico. El término «autólogo» hace referencia a que las células, línea celular o población de células utilizada para tratar los pacientes se originan en dicho paciente o de un donante de antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés) compatible. El término «alogénico» hace referencia a que las células o población de células utilizada para tratar los pacientes no se originan en dicho paciente sino de un donante.

En una realización, la supervivencia de dichas células T de la invención en el huésped se controla utilizando un tratamiento anti-CD20 (rituximab) y/o de QBEN10.

#### *Sujetos*

Las composiciones de la presente invención pueden resultar de utilidad en el tratamiento de un sujeto que se ha caracterizado como presentando células o tejidos patológicos que expresan CD22, o que se sospecha que presenta células o tejidos patológicos que expresan CD22. Por ejemplo, entre los sujetos beneficiados del tratamiento según la invención se incluyen sujetos con LLA-B o LLC, LLA-B refractaria o LLA-B recidivante.

En una realización preferente, los pacientes son niños que sufren de LLA-B, LLA-B recidivante, LLA-B refractaria (indicación pediátrica).

El tratamiento con las células T modificadas según la invención puede ser en combinación con una o más terapias contra cáncer seleccionado del grupo de terapia de anticuerpos, quimioterapia, terapia de citoquinas, terapia de células dendríticas, terapia génica, terapia hormonal, terapia de luz láser y terapia de radiación.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente activa de UCART22 para el tratamiento de niños que sufren de LLA-B, LLA-B recidivante o LLA-B refractaria.

La presente invención proporciona, además, una composición farmacéutica que comprende un UCART22 y un excipiente farmacéuticamente aceptable para el tratamiento de niños que sufren LLA-B, LLA-B recidivante o LLA-B refractaria.

En una realización preferente, una composición farmacéutica comprende el UCART22 de la invención y un compuesto de la familia de briostatinas, preferentemente briostatina-1, y un excipiente farmacéuticamente aceptable para el tratamiento de niños que sufren de LLA-B, LLA-B recidivante o LLA-B refractaria.

Según una realización preferente de la invención, dicho tratamiento puede administrarse en pacientes sometidos a un tratamiento inmunosupresor (tratamiento de acondicionamiento), más preferentemente a linfodepleción. En efecto, la presente invención preferentemente se basa en células o poblaciones celulares que se han hecho resistentes a por lo menos un agente inmunosupresor debido a la inactivación de un gen codificante de un receptor para dicho agente inmunosupresor. En el presente aspecto, el tratamiento inmunosupresor o de linfodepleción debería ayudar a la selección y expansión de las células T según la invención dentro del paciente y a la destrucción de las células cancerosas CD22.

La administración de las células o población celular según la presente invención puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, incluyendo la inhalación de aerosol, la inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse en el paciente por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, mediante inyección intravenosa o intralinfática, o por vía intraperitoneal. En una realización, las composiciones celulares de la presente invención se administran preferentemente mediante inyección intravenosa.

La administración de las células o población celular puede consistir en la administración de  $10^4$  a  $10^9$  células por kg de peso corporal, preferentemente  $10^5$  a  $10^9$  células/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores enteros de números de células comprendidos dentro de dichos intervalos. Las células o poblaciones celulares pueden administrarse en una o más dosis, preferentemente varias dosis sucesivas (readministración) para evitar el escape (células recidivantes). En otra realización, dicha cantidad eficaz de células se administra como una sola dosis o en varias dosis. En otra realización, dicha cantidad eficaz de células se administra como más de una dosis a lo largo de un periodo de tiempo.

La planificación temporal de la administración es a criterio del médico responsable y depende del estado clínico del paciente.

Las células o poblaciones celulares pueden obtenerse de cualquier fuente, tal como un banco de sangre o de un donante. Aunque las necesidades individuales varían, la determinación de los intervalos óptimos de las cantidades eficaces de un tipo celular dado para una enfermedad o afección particular se encuentra comprendida en los conocimientos del experto en la materia. Una cantidad eficaz significa una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico o profiláctico. La dosis administrada es dependiente de la edad, salud y peso del receptor, tipo de tratamiento concurrente, si alguno, frecuencia del tratamiento y naturaleza del efecto deseado.

El presente UCART22 está diseñado para ser eficiente, aunque no excesivamente activo, y para limitar la tormenta de citoquinas. En el caso de los pacientes con respuesta excesiva, la presente invención puede combinarse con una medicación adecuada para prevenir o bloquear la tormenta de citoquinas, tal como fármacos anti-IL-6.

En otra realización, dicha cantidad eficaz de células o composición que comprende dichas células es para la administración parenteral. Dicha administración puede ser una administración intravenosa. Dicha administración puede realizarse directamente mediante inyección en un tumor.

En determinadas realizaciones de la presente invención, las células son para la administración en un paciente junto con (p. ej., antes, simultáneamente o después) de cualquier número de modalidades de tratamiento pertinentes, incluyendo, aunque sin limitación, el tratamiento con agentes tales como terapia antivírica, cidofovir e interleuquina-2. El tratamiento de citarabina (también conocida como ARA-C) o natalizumab para los pacientes de esclerosis múltiple (EM) o el tratamiento de efaliztimab para los pacientes de soriasis u otros tratamientos para pacientes de leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML, por sus siglas en inglés). En realizaciones adicionales, las células T de la invención pueden resultar útiles en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpo u otros agentes de inmunoablación, tales como Campath, alemtuzumab, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias de anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citoquinas e irradiación. Estos fármacos inhiben la fosfatasa dependiente del calcio calcineurina (ciclosporina y FK506) o inhiben la quinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina) (Henderson, Naya et al., 1991; Liu, Albers et al. 1992; Bierer, Hollander et al. 1993).

En una realización adicional, las composiciones celulares de la presente invención son para la administración en el paciente junto con (p. ej., antes, simultáneamente o después) del trasplante de médula ósea, terapia ablativa de células T utilizando agentes quimioterapéuticos, tales como fludarabina, terapia de radiación de haz externo (XRT, por sus siglas en inglés), ciclofosfamida o anticuerpos, tales como OKT3 o Campath. En otra realización, las composiciones celulares de la presente invención se administran tras la terapia ablativa de células B, tal como agentes que reaccionan con CD20, p. ej., rituxán, o QBEN10. Por ejemplo, en un caso, el sujeto puede someterse a tratamiento estándar con quimioterapia de dosis elevada seguido del trasplante de células sanguíneas periféricas. En determinados casos, tras el trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunitarias expandidas de la presente invención. En un caso adicional, se administran células expandidas antes o después de la cirugía.

En otro caso, tras el trasplante, los sujetos reciben un agente que reacciona con CD20, p. ej., rituxán o ritiximab, preferentemente con un agente que reacciona con CD22 y CD20.

#### Otras definiciones

- Los residuos aminoácidos en una secuencia polipeptídica se designan en la presente memoria de acuerdo con el código de una letra, en el que, por ejemplo, Q significa Gln o residuo de glutamina, R significa Arg o residuo de arginina, y D significa Asp o residuo de ácido aspártico.
- La sustitución de aminoácido significa la sustitución de un residuo aminoácido por otro, por ejemplo la sustitución de un residuo de arginina por un residuo de glutamina en una secuencia peptídica es una sustitución de aminoácido.
- Los nucleótidos se designan del modo siguiente: se utiliza el código de una letra para designar la base de un nucleótido: a es adenina, t es timina, c es citosina y g es guanina. Para los nucleótidos degenerados, r representa g o a (nucleótidos purina), k representa g o t, s representa g o c, w representa a o t, m representa a o c, y representa t o c (nucleótidos pirimidina), d representa g, a o t, v representa g, a o c, b representa g, t o c, h representa a, t o c, y n representa g, a, t o c.
- «Tal como se utiliza en la presente memoria», «ácido nucleico» o «polinucleótidos» se refieren a nucleótidos y/o polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), y fragmentos generados mediante cualquiera de entre ligación, escisión, acción de endonucleasa y acción de exonucleasa. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas de monómeros que son nucleótidos naturales (tales como ADN y ARN), o análogos de nucleótidos naturales (p. ej., formas enantioméricas de nucleótidos naturales), o una

combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden presentar alteraciones en las fracciones de azúcar y/o en fracciones de base pirimidina o purina. Entre las modificaciones de azúcar se incluyen, por ejemplo, la sustitución de uno o más grupos hidroxilo con halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido, o azúcares, pueden funcionalizarse como éteres o ésteres. Además, la fracción de azúcar entera puede sustituirse con estructuras estérica y electrónicamente similares, tales como azúcares aza y análogos de azúcar carbocíclicos. Entre los ejemplos de modificaciones en una fracción base se incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas, u otros sustitutos heterocíclicos bien conocidos. Los monómeros de ácido nucleico pueden unirse mediante enlaces fosfodiéster o análogos de tales enlaces. Los ácidos nucleicos pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena.

- La expresión «receptor de antígeno quimérico» (CAR) se refiere a moléculas que combinan un dominio de unión con un componente presente en la célula diana, por ejemplo una especificidad basada en anticuerpo para un antígeno deseado (p. ej., un antígeno tumoral) con un dominio intracelular activador de receptor de célula T para generar una proteína quimérica que muestra una actividad inmunitaria celular antidiana específica. Generalmente, CAR consiste en un anticuerpo de cadena sencilla extracelular (scFvFc) fusionado con el dominio de señalización intracelular de la cadena zeta del complejo de receptor de antígeno de células T (scFvFc:ζ) y presenta la capacidad, al expresarse en células T, de redirigir el reconocimiento de antígeno basándose en la especificidad del anticuerpo monoclonal. Un ejemplo de CAR utilizado en la presente invención es un CAR dirigido contra el antígeno CD22 y comprende, como ejemplos no limitativos, la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 15.
- El término «endonucleasa» se refiere a cualquier enzima de tipo salvaje o variante capaz de catalizar la hidrólisis (corte) de enlaces entre ácidos nucleicos dentro de una molécula de ADN o ARN, preferentemente una molécula de ADN. Las endonucleasas no cortan la molécula de ADN o ARN con independencia de su secuencia, pero reconocen y cortan la molécula de ADN o ARN en secuencias polinucleótidas específicas, denominadas adicionalmente «secuencias diana» o «sitios diana». Las endonucleasas pueden clasificarse como endonucleasas de corte raro en el caso de que presenten normalmente un sitio de reconocimiento polinucleótido de longitud superior a 12 pares de bases (pb), más preferentemente de 14 a 55 pb. Las endonucleasas de corte raro incrementan significativamente HR mediante la inducción de roturas de doble cadena (DSB, por sus siglas en inglés) del ADN en un locus definido (Perrin, Buckle et al., 1993; Rouet, Smih et al. 1994; Chouluka, Perrin et al. 1995; Pingoud and Silva 2007). Las endonucleasas de corte raro pueden ser, por ejemplo, una endonucleasa de mantenimiento (Paques y Duchateau, 2007), una nucleasa de dedos de zinc quimérica (ZFN, por sus siglas en inglés) resultante de la fusión de dominios de dedos de zinc modificados con el dominio catalítico de una enzima de restricción, tal como FokI (Porteus y Carroll, 2005), una endonucleasa Cas9 del sistema CRISPR (Gasiunas, Barrangou et al., 2012; Jinek, Chylinski et al. 2012; Cong, Ran et al. 2013; Mali, Yang et al. 2013) o una endonucleasa química (Eisenschmidt, Lanio et al. 2005; Arimondo, Thomas et al. 2006). En las endonucleasas químicas, se conjuga un agente de corte químico o peptídico con un polímero de ácidos nucleicos o con otro ADN que reconoce una secuencia diana específica, dirigiendo de esta manera la actividad de corte a una secuencia específica. Las endonucleasas químicas también comprenden nucleasas sintéticas como conjugados de ortofenantrolina, una molécula de escisión de ADN y oligonucleótidos formadores de triplex (TFO, por sus siglas en inglés), que es conocido que se unen a secuencias de ADN (Kalish y Glazer, 2005). Dichas endonucleasas químicas están comprendidas en el término «endonucleasa» según la presente invención.
- La expresión «nucleasa TALE» (TALEN, por sus siglas en inglés) se refiere a una proteína de fusión que consiste en un dominio de unión a ácidos nucleicos normalmente derivado de un efector de tipo activador de transcripción (TALE) y un dominio catalítico de nucleasa para cortar una secuencia diana de ácido nucleico. El dominio catalítico es preferentemente un dominio de nucleasa y más preferentemente un dominio que presenta actividad de endonucleasa, como, por ejemplo, I-TevI, CoIE7, NucA y Fok-I. En una realización particular, el dominio de TALE puede fusionarse con una meganucleasa como, por ejemplo, I-CreI y I-OnuI o variante funcional de los mismos. En una realización más preferente, dicha nucleasa es una nucleasa TALE monomérica. Una nucleasa TALE monomérica es una nucleasa TALE que no requiere la dimerización para el reconocimiento y corte específicos, tal como las fusiones de repeticiones de TAL modificadas con el dominio catalítico de I-TevI descrito en el documento n.º WO2012138927. El efector de tipo activador de transcripción (TALE) son proteínas de la especie bacteriana *Xanthomonas* comprende una pluralidad de secuencias repetidas, en donde cada repetición comprende diresiduos en las posiciones 12 y 13 (RVD) que son específicas de cada base nucleótida de la secuencia diana de ácidos nucleicos. Los dominios de unión con propiedades de unión de ácidos nucleicos base a base modulares similares (MBBD, por sus siglas en inglés) también pueden derivarse de nuevas proteínas modulares recientemente encontradas por el solicitante en diferentes especies bacterianas. Las nuevas proteínas modulares presentan la ventaja de mostrar más variabilidad de secuencia que las repeticiones de TAL. Preferentemente, los diresiduos variables repetidos (RVD, por sus siglas en inglés) asociados al reconocimiento de los diferentes nucleótidos son HD para reconocer la C, NG para reconocer la T, NI para reconocer la A, NN para reconocer la G o A, NS para reconocer la A, C, G o T, HG para reconocer la T, IG para reconocer la T, NK para reconocer la G, HA para reconocer la C, ND para reconocer la C, HI para reconocer la C, HN para reconocer la G, NA para reconocer la G, SN para reconocer la G o A y YG para reconocer la T, TL para reconocer la A, VT para reconocer la A o G y SW para reconocer la A. En otra realización, los aminoácidos críticos 12 y 13 pueden mutarse a otros residuos aminoácidos con el fin de modular su especificidad para los nucleótidos A, T, C y G, y en particular, para potenciar esta especificidad. Ya se han descrito y utilizado nucleasas TAL para estimular el reconocimiento génico y las modificaciones génicas (Boch, Scholze et al., 2009; Moscou y Bogdanove 2009; Christian, Cermak et al. 2010; Li, Huang et al. 2011). Las nucleasas TAL personalizadas se encuentran disponibles comercialmente bajo el nombre comercial «TALEN» (Collectis, 8 rue de la Croix Jarry, 75013 Paris, Francia).

La endonucleasa de corte raro según la presente invención también puede ser una endonucleasa Cas9, una endonucleasa de dedos de zinc o una endonucleasa MegaTAL. La herramienta de ingeniería genómica se ha desarrollado basándose en la nucleasas Cas9 guiada por ARN (Gasiunas, Barrangou et al., 2012; Jinek, Chylinski et al. 2012; Cong, Ran et al. 2013; Mali, Yang et al. 2013) a partir del sistema inmunitario adaptativo CRISPR (por sus siglas en inglés, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) procariótico de tipo II (para una revisión ver Sorek, Lawrence et al., 2013). El sistema asociado a CRISPR (Cas, por sus siglas en inglés) fue encontrado por primera vez en bacterias y actúa como una defensa frente al ADN foráneo, vírico o plasmídico. La ingeniería genómica mediada por CRISPR en primer lugar procede mediante selección de una secuencia diana con frecuencia flanqueada por un motivo de secuencia corto, denominado motivo contiguo al protoespaciador (PAM, por sus siglas en inglés). Tras la selección de la secuencia diana, se genera un ARNcr específico, complementario a dicha secuencia diana. El ARNcr transactivador (ARNcr\_tra) requerido en los sistemas CRISPR de tipo II se aparea con el ARNcr y se une a la proteína Cas9 proporcionada. Cas9 actúa como un anclaje molecular, facilitando el apareamiento de bases del ARNcr\_tra con el ARNcr (Deltcheva, Chylinski et al., 2011). En este complejo ternario, la estructura dual ARNcr\_tra:ARNcr actúa como ARN guía que dirige la endonucleasa Cas9 a la secuencia diana afín. El reconocimiento de diana por el complejo Cas9-ARNcr\_tra:ARNcr es iniciado por el escaneo de la secuencia diana para la homología entre la secuencia diana y el ARNcr. Además de la complementariedad de la secuencia diana-ARNcr, el direccionamiento del ADN requiere la presencia de un motivo corto contiguo al protoespaciador (motivo contiguo al protoespaciador: PAM). Tras el apareamiento entre el ARN dual y la secuencia diana, Cas9 seguidamente introduce una rotura roma en la doble cadena 3 bases cadena arriba del motivo PAM (Garneau, Dupuis et al., 2010).

La endonucleasa de corte raro puede ser una endonucleasa de mantenimiento, también conocido bajo el nombre de meganucleasa. Dichas endonucleasas de reconocimiento son bien conocidas de la técnica (Stoddard, 2005). Las endonucleasas de reconocimiento reconocen una secuencia diana de ADN y generan una rotura de cadena sencilla o de doble cadena. Las endonucleasas de mantenimiento son altamente específicas, y reconocen sitios de ADN diana de entre 12 y 45 pares de bases (pb) de longitud, habitualmente de entre 14 y 40 pb de longitud. La endonucleasa de mantenimiento según la invención puede corresponder, por ejemplo, a una endonucleasa LAGLIDADG, a una endonucleasa HNH o a una endonucleasa GIY-YIG. La endonucleasa de mantenimiento preferente según la presente invención puede ser una variante *I-CreI*.

- La expresión «vector de administración» o «vectores de administración» se refiere a cualquier vector de administración que puede utilizarse en la presente invención para poner en contacto celular (es decir, «puesta en contacto») o entregar en el interior de las células o compartimientos subcelulares (es decir, «introducción») agentes/compuestos químicos y moléculas (proteínas o ácidos nucleicos) necesarios en la presente invención. Incluye, aunque sin limitación, vectores de administración liposómica, vectores de administración vírica, vectores de administración de fármaco, portadores químicos, portadores poliméricos, lipoplejos, poliplexos, dendrímeros, microburbujas (agentes de contraste de ultrasonidos), nanopartículas, emulsiones u otros vectores de transferencia apropiados. Estos vectores de administración permiten la administración de moléculas, compuestos químicos, macromoléculas (genes, proteínas) u otros vectores, tales como plásmidos, péptidos desarrollados por Diatos. En estos casos, los vectores de administración son portadores de moléculas. La expresión «vector de administración» o «vectores de administración» también se refiere a métodos de administración para realizar la transfección.
- Los términos «vector» o «vectores» se refieren a una molécula de ácidos nucleicos capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un «vector» en la presente invención incluye, aunque sin limitación, un vector vírico, un plásmido, un vector de ARN o una molécula de ADN o ARN lineal o circular que puede consistir en ácidos nucleicos cromosómicos, no cromosómicos, semisintéticos o sintéticos. Los vectores preferentes son aquellos capaces de replicación autónoma (vector episómico) y/o la expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos (vectores de expresión). El experto en la materia conoce, y se encuentran disponibles comercialmente, un gran número de vectores adecuados

Entre los vectores víricos se incluyen retrovirus, adenovirus, parvovirus (p. ej., virus adenoasociados, en particular vaa6), coronavirus, virus ARN de cadena negativa, tal como ortomixovirus (p. ej., virus influenza), rabdovirus (p. ej., virus de la rabia y virus de la estomatitis vesicular), paramixovirus (p. ej., del sarampión y Sendai), virus ARN de cadena positiva, tales como picornavirus y alfavirus, y virus ADN de doble cadena, incluyendo adenovirus, herpesvirus (p. ej., virus herpes simplex de tipos 1 y 2, virus de Epstein-Barr y citomegalovirus) y poxvirus (p. ej., vaccinia, virus de la viruela aviar y virus de la viruela del canario). Entre otros virus se incluyen el virus Norwalk, togavirus, flavivirus, reovirus, papovavirus, hepadnavirus y virus de la hepatitis, por ejemplo. Entre los ejemplos de retrovirus se incluyen: leucosis-sarcoma aviar, virus de tipo C de mamífero, virus de tipo B, virus de tipo D, grupo HTLV-BLV, lentivirus, espumavirus (Coffin, J. M., Retroviridae: The viruses and their replication, In Fundamental Virology, tercera edición, B. N. Fields, et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996).

- La expresión «vector lentivírico» se refiere a vectores lentivíricos basados en el VIH que son muy prometedores para la administración génica debido a su capacidad de empaquetamiento relativamente grande, menor inmunogenicidad y su capacidad de transducir establemente con alta eficiencia un amplio abanico de diferentes tipos celulares. Los vectores lentivíricos se generan habitualmente tras la transfección transitoria de tres (empaquetamiento, cubierta y transferencia) o más plásmidos en células productoras. Como el VIH, los vectores lentivíricos entran en la célula diana mediante la interacción de las glucoproteínas de superficie vírica con

receptores sobre la superficie celular. Al entrar, el ARN vírico experimenta transcripción inversa, que está mediada por el complejo vírico de transcriptasa inversa. El producto de la transcripción inversa es un ADN vírico lineal de doble cadena que es el sustrato para la integración vírica en el ADN de las células infectadas. La expresión «vectores lentivíricos (o LV) integrativos» se refiere a vectores, como ejemplo no limitativo, que son capaces de integrarse en el genoma de la célula diana. En el otro extremo «vectores lentivíricos no integrativos (NILV, por sus siglas en inglés)» se refiere a vectores de transporte génico eficientes que no se integran en el genoma de la célula diana mediante la acción de la integrasa vírica.

- Los vectores de transporte y vectores pueden estar asociados o combinarse con cualesquiera técnicas de permeabilización celular, tales como la sonoporación o la electroporación, o derivados de estas técnicas.
- El término «célula» o «células» pretende referirse a cualquier célula viva eucariótica, células primarias y líneas celulares derivadas de dichos organismos para cultivos *in vitro*.
- La expresión «célula primaria» o «células primarias» pretende referirse a células obtenidas directamente de tejido vivo (es decir, material de biopsia) y establecerse para el crecimiento *in vitro*, que han experimentado muy pocas duplicaciones poblacionales y, por lo tanto, son más representativos de los componentes funcionales y características principales de los tejidos de los que se derivan, en comparación con líneas celulares tumorigénicas o artificialmente immortalizadas.

Como líneas celulares de ejemplo no limitativo pueden seleccionarse células del grupo que consiste en células CHO-K1, células HEK293, células Caco2, células U2-OS, células NIH 3T3, células NSO, células SP2, células CHO-S, células DG44, células K-562, células U-937, células MRCS, células IMR90, células Jurkat, células HepG2, células HeLa, células HT-1080, células HCT-116, células Hu-h7, células Huvec y células Molt 4.

La totalidad de dichas líneas celulares puede modificarse mediante el método de la presente invención para proporcionar modelos de línea celular para producir, expresar, cuantificar, detectar, estudiar un gen o una proteína de interés; estos modelos también pueden utilizarse para cribar moléculas biológicamente activas de interés en la investigación y producción, y diversos campos, tales como la química, biocombustibles, terapéutica y agronomía a modo de ejemplos no limitativos.

- El término «mutación» se refiere a la sustitución, delección, inserción de hasta uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, veinte, veinticinco, treinta, cuarenta, cincuenta o más nucleótidos/aminoácidos en un polinucleótido (ADNc, gen) o una secuencia polipeptídica. La mutación puede afectar a la secuencia codificante de un gen o su secuencia reguladora. También puede afectar a la estructura de la secuencia genómica o a la estructura/estabilidad del ARNm codificado.
- El término «variante» o «variantes» se refiere a una variante repetida, una variante, una variante de unión de ADN, una variante de nucleasa TALE, una variante de polipéptido obtenido mediante mutación o sustitución de por lo menos un residuo en la secuencia de aminoácidos de la molécula parental.
- La expresión «variante funcional» se refiere a un mutante catalíticamente activo de una proteína o de un dominio proteico; dicho mutante puede presentar la misma actividad que su proteína o dominio proteico parental, o propiedades adicionales, o mayor o menor actividad.
- El término «identidad» se refiere a una identidad de secuencia entre dos moléculas de ácidos nucleicos o polipéptidos. Puede determinarse la identidad mediante comparación de una posición en cada secuencia que puede alinearse con fines comparativos. En el caso de que una posición en la secuencia comparada esté ocupada por la misma base, las moléculas serán idénticas en esa posición. Un grado de similitud o identidad entre secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos es una función del número de nucleótidos idénticos o correspondientes en posiciones compartidas por las secuencias de ácidos nucleicos. Pueden utilizarse diversos algoritmos y/o programas de alineación para calcular la identidad entre dos secuencias, incluyendo FASTA o BLAST, que están disponibles como parte del paquete de análisis de secuencias GCG (University of Wisconsin, Madison, Wis.) y pueden utilizarse con, p. ej., la configuración por defecto. Por ejemplo, están contemplados los polipéptidos que presentan una identidad de por lo menos 70 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % respecto a polipéptidos específicos indicados en la presente memoria y preferentemente que muestran sustancialmente las mismas funciones, así como un polinucleótido codificante de dichos polipéptidos. A menos que se indique lo contrario, la puntuación de similitud se basará en la utilización de BLOSUM62. En el caso de que se utilice BLAST, el porcentaje de similitud se basa en la puntuación de positivos de BLASTP y el porcentaje de identidad de secuencias se basa en la puntuación de identidades de BLASTP. Las «identidades» de BLASTP muestran el número y fracción de residuos totales en los pares de secuencias de alta puntuación que son idénticos, y los «positivos» de BLASTP muestran el número y fracción de residuos para los que las puntuaciones de alineación presentan valores positivos y que son similares entre sí. Las secuencias de aminoácidos que presentan dichos grados de identidad o similitud o cualquier grado intermedio de identidad o similitud respecto a las secuencias de aminoácidos dadas a conocer en la presente memoria están contempladas y comprendidas en la presente exposición. Las secuencias polinucleótidas de polipéptidos similares se deducen utilizando el código genético y pueden obtenerse por medios convencionales, en particular mediante traducción inversa de su secuencia de aminoácidos utilizando el código genético.
- La expresión «dominio transductor de señales» o «ligando coestimulador» se refiere a una molécula en una célula presentadora de antígeno que se une específicamente a una molécula coestimuladora afín sobre una célula T, proporcionando de esta manera una señal que, además de la señal primaria proporcionada mediante, por ejemplo,

la unión de un complejo TCR/CD3 con una molécula del CHM cargada con péptido, actúa de mediador en una respuesta de células T, incluyendo, aunque sin limitación, la activación de la proliferación, la diferenciación y similares. Un ligando coestimulador puede incluir, aunque sin limitación, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulador inducible (ICOS-L, por sus siglas en inglés), molécula de adhesión intercelular (ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, receptor de linfotóxina-beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, un agonista o anticuerpo que se une al receptor de ligando de tipo Toll y un ligando que se une específicamente a B7-H3. CD28 está excluido de dicha lista. Un ligando coestimulador también comprende, entre otros, un anticuerpo que se une específicamente a una molécula coestimuladora presente sobre una célula T, tal como, aunque sin limitación, CD27, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente a CD83.

La expresión «molécula coestimuladora» se refiere a la pareja de unión afín sobre una célula T que se une específicamente a un ligando coestimulador, mediando de esta manera en una respuesta coestimuladora por la célula, tal como, aunque sin limitación, la proliferación. Entre las moléculas coestimuladoras se incluyen, aunque sin limitación, una molécula del CHM de clase I, BLTA y un receptor de ligando de tipo Toll.

Una «señal coestimuladora» tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una señal, que en combinación con la señal primaria, tal como la ligación de TCR/CD3, conduce a la proliferación de las células T y/o la regulación positiva o la regulación negativa de moléculas clave.

La expresión «dominio de unión a ligando extracelular» tal como se utiliza en la presente memoria se define como un oligopéptido o polipéptido que es capaz de unirse a un ligando. Preferentemente, el dominio es capaz de interactuar con una molécula de superficie celular. Por ejemplo, el dominio de unión a ligando extracelular puede seleccionarse para reconocer un ligando que actúa como un marcador de superficie celular sobre las células diana asociado a un estado de enfermedad particular. De esta manera, entre los ejemplos de marcadores de superficie celular que pueden actuar como ligandos se incluyen los asociados a infecciones víricas, bacterianas y parasitarias, enfermedades autoinmunitarias y células de cáncer.

El término «sujeto» o «paciente» tal como se utiliza en la presente memoria incluye todos los miembros del reino animal, incluyendo primates no humanos y seres humanos, preferentemente seres humanos. En una realización, los pacientes son pacientes con LLA agresiva, o refractaria o recidivante, o LLC agresiva, refractaria o recidivante.

Un mamífero es cualquier vertebrado de sangre caliente de la clase mamíferos, preferentemente un ser humano.

La expresión «dominio suicida o interruptores» o «interruptores de activación y desactivación de seguridad» se refiere a un dominio, habitualmente un dominio de superficie celular, reconocido por una molécula, proteína, compuesto químico, anticuerpo para inmunoseleccionar células expresantes y finalmente controlando su funcionamiento y supervivencia.

La descripción anteriormente proporcionada de la invención proporciona una manera y procedimiento de preparación y utilización de la misma de manera que cualquier experto en la materia esté habilitado para prepararla y utilizarla; esta habilitación se proporciona en particular para la materia objeto según las reivindicaciones adjuntas, que constituye una parte de la descripción original.

En donde se indica un límite o intervalo numérico en la presente memoria, se incluyen los extremos. Además, todos los valores y subintervalos comprendidos en un límite o intervalo numérico están específicamente incluidos como si estuviesen explícitamente indicados.

## MÉTODO GENERAL

### Cribado y selección de CAR

#### • Cultivos de células T primarias

Las células T se purificaron a partir de muestras de capa leucocitaria proporcionadas por EFS (Etablissement Français du Sang, Paris, Francia) utilizando medio de densidad de gradiente de Ficoll. Se recuperó la capa de PBMC. Las células T se activaron en medio X-Vivo™-15 (Lonza) complementado con 20 ng/ml de IL-2 humano, 5 % humano, y perlas Dynabeads CD3/CD28 activadores de linfocitos T humanos en una proporción 1:1 de perlas:células (Life Technologies)

#### • Transfección de ARNm de CAR

Las transfecciones de los ARNm de CAR codificantes de cada constructo de CAR se llevaron a cabo el día 4 o el día 11 después de la purificación y activación de las células T. Las células se diluyeron inmediatamente en medio X-Vivo™-15 y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Se añadió IL-2 2 h después de la electroporación a una concentración de 20 ng/ml.

• *Transducción de células T*

Se introdujeron vectores codificantes de un CAR CD22 en células T tal como se ha indicado anteriormente. La detección de CAR en la superficie de las células T se llevó a cabo utilizando una proteína recombinante consistente en el dominio extracelular de la proteína CD22 humana (proteína completa, parte distal de CD22 o parte proximal de CD22) fusionada junto con un fragmento Fc de IgG1 murina. La unión de dicha proteína a la molécula de CAR se detectó con un anticuerpo secundario conjugado con PE (Jackson Immunoresearch) con diana en la parte Fc de ratón de la proteína y se analizó mediante citometría de flujo.

*Inactivación de uno o más genes específicos en células T primarias*

La inactivación del gen o genes específicos en células T primarias puede llevarse a cabo antes, preferentemente después de la introducción de CAR CD22 en las células utilizando endonucleasas tales como la endonucleasa TAL, opcionalmente endonucleasas Crispr Cas9, diseñadas correspondientemente. Se inactiva por lo menos un gen, pueden inactivarse uno, dos o tres genes en una etapa o en varias etapas sucesivas. En una realización preferente, se inactivaron dos genes, preferentemente el gen de TCR-alfa y un gen en el que la delección confiere resistencia a un fármaco seleccionado de análogos del nucleótido purina, alemtuzumab, platinos (cisplatino o carboplatino), anti-topoisomerasa I (irinotecán), antitopoisomerasa II (etopósido), metotrexato (análogos del ácido fólico), preferentemente análogos de nucleótido purina, alemtuzumab.

En general, se diseña y produce una nucleasa heterodimérica, en particular nucleasa TAL con diana en dos secuencias largas (denominadas «medio dianas») separadas por un espaciador dentro de un gen diana.

Cada constructo de nucleasa TALE puede clonarse en un vector de expresión de mamífero apropiado. El ARNm codificante de nucleasa TALE que corta una secuencia genómica diana puede sintetizarse a partir de plásmido portador de la secuencia codificante cadena abajo de un promotor. Se utilizan células T purificadas preactivadas con perlas recubiertas anti-CD3/CD28 y se transfectaron con cada uno de los 2 ARNm codificantes de ambas seminucleasas TALE. Las células pueden reactivarse con anti-CD28 soluble para medir la proliferación celular en diversos tiempos y el marcador de activación CD25 detectado para evaluar el estado de activación de las células.

• *Ensayo de degranulación (movilización de CD107a)*

Se incubaron células en placas de 96 pocillos, junto con una cantidad igual de células que expresan diversos niveles de la proteína diana (CD22). Se mantuvieron cocultivos durante 6 horas a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Se llevó a cabo la tinción con CD107a durante la estimulación celular, mediante la adición de un anticuerpo anti-CD107a fluorescente al inicio del cocultivo, junto con anti-CD49d, anti-CD28 y solución 1x monensina, a modo de control. Tras el periodo de incubación de 6 h, las células se tiñeron con un pigmento de viabilidad fijable y anti-CD8 conjugado con fluorocromo y se analizaron mediante citometría de flujo. La actividad de degranulación se determinó como el % de células CD8<sup>+</sup>/CD107a<sup>+</sup>, y mediante la determinación de la señal media de intensidad de fluorescencia (IMF) para la tinción de CD107a de las células CD8<sup>+</sup>. Los ensayos de degranulación se llevaron a cabo 24 h después de la transfección del ARNm.

• *Ensayo de liberación de IFN gamma*

Veinticuatro h después de la transfección del ARNm, se incubaron las células T expresantes de CAR CD22 junto con líneas celulares expresantes de diversos niveles de la proteína diana durante 24 horas a 37 °C. Se recuperaron los sobrenadantes y se realizó la detección de IFN-gamma en los sobrenadantes de cultivo celular mediante ensayo ELISA.

• *Ensayo de citotoxicidad*

Se incubaron las células junto con las células diana (expresantes de diferentes niveles de CD22) o células (de control negativo). Las células diana y las células de control se marcaron con pigmentos intracelulares fluorescentes (CFSE o violeta CellTrace) antes de cocultivarlas con células T CAR<sup>+</sup>. Los cocultivos se incubaron durante 4 horas a 37 °C. Después de este periodo de incubación, se marcaron con un pigmento de viabilidad fijable y se analizaron mediante citometría de flujo. Se determinó la viabilidad de cada población celular (células diana o células de control negativo) y se calculó el % de la lisis celular específica. Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo 48 h después de la transfección del ARNm.

• *Modelo antitumoral de ratón*

Se implantaron células tumorales en ratones inmunodeficientes (LLA-B CD22 procedente de pacientes) o células expresantes de proteína diana-luciferasa en el flanco. Posteriormente, se implantaron células en cerebros de ratón. El trasplante en serie en generaciones posteriores de ratones continuó el mantenimiento de líneas celulares de xenoinjerto *in vivo*. Opcionalmente, los ratones recibieron un tratamiento anticáncer antes/junto con la inyección de



células T CAR<sup>+</sup> (alemtuzumab y/o gripe). A continuación, los ratones recibieron inyecciones iv (2 o 7 días después de la inyección de la línea celular tumoral) de diferentes dosis de las células T CAR<sup>+</sup> de ensayo, o de células T que no expresaban CAR CD22. Se determinaron las señales bioluminiscentes el día de la inyección de células T (D0), en D7, 14, 21, 28 Y 40 después de la inyección de células T con el fin de realizar un seguimiento de la progresión tumoral en los diferentes animales.

Estudio de fase I de escalado de dosis para evaluar la seguridad, la expansión y la persistencia de CART CD22 alogénico (UCART22) en pacientes con leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B) recidivante o refractaria o MRD<sup>+</sup> CD2<sup>+</sup>.

#### *Antecedentes y justificación*

Con los regímenes quimioterapéuticos multifármaco actuales, se observa una supervivencia a largo plazo en >80 % de los casos de leucemia linfoblástica aguda infantil y en aproximadamente el 40 % de la LLA adulta (1). La intensificación adicional de la quimioterapia no ha demostrado ser eficaz (2). Se han producido avances significativos en nuestra comprensión de la biología de la LLA en los últimos pocos años que proporcionan una oportunidad para la «terapia dirigida» (3, 4).

La LLA recidivante/refractaria sigue siendo una enfermedad complicada. Las terapias post-recaída conducen a una segunda remisión completa (RC2) en 30 % a 40 % de los pacientes, con una supervivencia global (SG) a los 5 años de solo 10 % aproximadamente. En el estudio publicado más grande de pacientes adultos con LLA recidivante hasta la fecha, Fielding y colaboradores analizaron los resultados de pacientes LLA adultos recidivantes que habían sido tratados en el ensayo MRC UKALLXII/ECOG E2993 (5). De los 1508 pacientes evaluables, 1372 (91 %) alcanzaron una RC1, de los que 609 (44 % de los pacientes de RC1) presentaron una recaída en una mediana de 11 meses. La SG a los 5 años fue de solo 7 % para los pacientes con recaída. La mediana de SG para los pacientes en recaída fue de 5,5 meses. Tavernier y colaboradores informaron de resultados de 421 pacientes de LLA que experimentaron una primera recaída tratados en el ensayo francés LALA-94 (6). Se consiguió una RC2 en 44 % de los pacientes, con una mediana de supervivencia sin enfermedad (SSE) de 5,2 meses y una mediana de SG de 6,3 meses. Oriol y colaboradores informaron de los resultados de 263 pacientes de LLA en primera recaída tratados en 4 ensayos PETHEMA consecutivos (7). La RC2 se consiguió en 45 % de los pacientes, una tasa similar a la de los ensayos LALA franceses. La mediana de SG tras la recaída fue de 4,5 meses, con una SG a los 5 años de 10 %.

La expresión de CD22 ocurre en >90 % de los pacientes con LLA y es un diana terapéutica válida. Las terapias celulares, tales como las terapias de células T con receptor de antígeno quimérico (CAR) se están usando crecientemente para tratar pacientes con neoplasias malignas hemáticas (8-16). En pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA) en recaída, se ha informado de una tasa de respuesta completa muy alta (80-90 %) con células CART CD19 autólogas (12). De manera similar, se ha observado una tasa de respuesta de 40-50 % en pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) recidivante sometidos a terapias con CART CD19 autólogo.

El presente estudio evalúa células CART alogénicas dirigidas contra CD22 en pacientes con LLA-B CD22 recidivante y/o refractaria.

#### *Objetivos*

##### *Objetivos principales*

Evaluar la seguridad y tolerabilidad de las CART CD22 alogénicas y determinar la dosis máxima tolerada (DMT).

##### *Objetivos secundarios*

Determinar la eficacia de las CART CD22 alogénicas.

Determinar la incidencia de EICH.

##### *Objetivos exploratorios*

Determinar la expansión, fenotipo, tráfico y persistencia de células CART infundidas.

#### *Criterios de inclusión*

1. LLA positiva para CD22 recidivante o refractaria (para la fase de expansión: se permiten pacientes con enfermedad MRD<sup>+</sup>).
2. Pacientes de edad ≥2 años
3. Estado funcional según ECOG ≤2
4. Función orgánica normal, incluyendo bilirrubina ≤2 mg/dl, ALT/AST <3x LSN, y creatinina ≤2 mg/dl
5. Fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) ≥40 %

*Criterios de exclusión*

1. Paciente embarazada o en lactancia.
2. Pacientes con infecciones activas no controladas.
3. Recaída extramedular aislada (es decir, testicular, SNC).
4. Leucemia del SNC activa conocida. Nota: Los pacientes con antecedentes de enfermedad del SNC que ha sido tratada eficazmente serán elegibles siempre que hayan estado en remisión del SNC >4 semanas antes de la inclusión.
5. Hepatitis B activa o hepatitis C activa.
6. Infección por VIH.
7. EICH activa que requiere terapia sistémica de esteroides. Es aceptable la terapia de esteroides para la sustitución fisiológica.
8. Han recibido una infusión linfocitaria de donante (ILD) en las 4 semanas previas a la infusión de CART CD22.
9. Han recibido un trasplante de células madre alogénicas en los 60 días previos a la infusión de CART CD22.

*Descripción del estudio*

Es un estudio de fase I. Hay 2 fases en este ensayo: escalado de dosis y expansión de la dosis.

Los pacientes reciben CART alogénico CD22 tras recibir quimioterapia de linfodepleción.

Escalado de dosis: Se estudiaron cuatro niveles de dosis en un diseño 3x3 estándar. Se prevé el reclutamiento de un total de 9 a 18 pacientes.

Nivel de dosis	Células UCART22/kg
-1	$1 \times 10^4$
1 (dosis de partida)	$1 \times 10^5$
2	$1 \times 10^6$
3	$5 \times 10^6$

Una vez se ha identificado el nivel de dosis recomendado en la fase 2 (R2PD, por sus siglas en inglés), se inicia la expansión de la dosis.

A continuación, se inscribe un total de 20 pacientes (10 R/R LLA; 10 post-SCT MRD<sup>+</sup>)

Tamaño muestral total: 29 a 38 pacientes

Número de pacientes con toxicidad limitante de dosis (TLD) a un nivel de dosis	Decisión
0 de 3	Escalar y evaluar en 3 pacientes posteriores.
1 de 3	Incluir 3 sujetos adicionales a este nivel de dosis.
$\geq 2$ de 3	Se ha excedido la dosis máxima tolerada (DMT). Se detendrá el escalado de dosis y se declarará este nivel como la dosis administrada máxima. Evaluar 3 pacientes adicionales en el nivel de dosis anterior si solo se trataron tres a esa dosis anteriormente.
1 de 6	Escalar dosis y evaluar en 3 pacientes posteriores.
$\leq 1$ de 6 a la dosis máxima inferior a la dosis administrada máxima.	Esta es la DMT.
$\geq 2$ de 6	Se ha excedido la dosis máxima tolerada (DMT). Se detendrá el escalado de dosis y se declarará este nivel como la dosis administrada máxima. Evaluar 3 pacientes adicionales en el nivel de dosis anterior si solo se trataron tres a esa dosis anteriormente.

El segundo estudio compara las células CART alogénicas con diana en CD22 con las células CART alogénicas con diana en CD22 y CD19 (2 formas) en pacientes con LLA-B CD19<sup>+</sup>CD22<sup>+</sup>.

*Objetivos**Objetivos principales*

Evaluar la seguridad y tolerabilidad de las CART CD19<sup>+</sup>CD22<sup>+</sup> alogénicas y determinar la dosis máxima tolerada (DMT).

## Objetivos secundarios

Determinar la eficacia de las CART CD22 alogénicas.

Determinar la incidencia de EICH.

## Objetivos exploratorios

Determinar la expansión, fenotipo, tráfico y persistencia de células CART infundidas.

## Criterios de inclusión

1. LLA positiva para CD22 recidivante o refractaria (para la fase de expansión: se permiten pacientes con enfermedad MRD<sup>+</sup>).
2. Pacientes de edad  $\geq 2$  años
3. Estado funcional según ECOG  $\leq 2$
4. Función orgánica normal, incluyendo bilirrubina  $\leq 2$  mg/dl, ALT/AST  $< 3 \times$  LSN, y creatinina  $\leq 2$  mg/dl
5. Fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI)  $\geq 40$  %

## Criterios de exclusión

1. Paciente embarazada o en lactancia.
2. Pacientes con infecciones activas no controladas.
3. Recaída extramedular aislada (es decir, testicular, SNC).
4. Leucemia del SNC activa conocida. Nota: Los pacientes con antecedentes de enfermedad del SNC que ha sido tratada eficazmente serán elegibles siempre que hayan estado en remisión del SNC  $> 4$  semanas antes de la inclusión.
5. Hepatitis B activa o hepatitis C activa.
6. Infección por VIH.
7. EICH activa que requiere terapia sistémica de esteroides. Es aceptable la terapia de esteroides para la sustitución fisiológica.
8. Han recibido una infusión linfocitaria de donante (ILD) en las 4 semanas previas a la infusión de CART CD22.
9. Han recibido un trasplante de células madre alogénicas en los 60 días previos a la infusión de CART CD22.

## Descripción del estudio

Es un estudio de fase I. Hay 2 fases en este ensayo. Escalado de dosis y expansión de la dosis.

Los pacientes reciben CART alogénico CD22 tras recibir quimioterapia de linfodepleción.

Escalado de dosis: Se estudiaron cuatro niveles de dosis en un diseño 3x3 estándar. Se prevé el reclutamiento de un total de 9 a 18 pacientes.

Nivel de dosis	Células UCART22/kg
-1	$1 \times 10^4$
1 (dosis de partida)	$1 \times 10^5$
2	$1 \times 10^6$
3	$5 \times 10^6$

Una vez se ha identificado el nivel de dosis recomendado en la fase 2 (R2PD), se inicia la expansión de la dosis.

A continuación, se inscribe un total de 20 pacientes (10 LLA R/R; 10 post-SCT MRD<sup>+</sup>)

Tamaño muestral total: 29 a 38 pacientes

Número de pacientes con toxicidad limitante de dosis (TLD) a un nivel de dosis	Decisión
0 de 3	Escalar y evaluar en 3 pacientes posteriores.
1 de 3	Incluir 3 sujetos adicionales a este nivel de dosis.
$\geq 2$ de 3	Se ha excedido la dosis máxima tolerada (DMT). Se detendrá el escalado de dosis y se declarará este nivel como la dosis administrada máxima. Evaluar 3 pacientes adicionales en el nivel de dosis anterior si solo se trataron tres a esa dosis anteriormente.

(continuación)

Número de pacientes con toxicidad limitante de dosis (TLD) a un nivel de dosis	Decisión
1 de 6	Escalar dosis y evaluar en 3 pacientes posteriores.
$\leq 1$ de 6 a la dosis máxima inferior a la dosis administrada máxima.	Esta es la DMT.
$\geq 2$ de 6	Se ha excedido la dosis máxima tolerada (DMT). Se detendrá el escalado de dosis y se declarará este nivel como la dosis administrada máxima. Evaluar 3 pacientes adicionales en el nivel de dosis anterior si solo se trataron tres a esa dosis anteriormente.

## REFERENCIAS

1. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2013;381(9881):1943-55.
2. Faderl S, Thomas DA, O'Brien S, Ravandi F, Garcia-Manero G, Borthakur G, et al. Augmented hyper-CVAD based on dose-intensified vincristine, dexamethasone, and asparaginase in adult acute lymphoblastic leukemia salvage therapy. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2011;11(1):54-9.
3. Mullighan CG. Genome sequencing of lymphoid malignancies. *Blood*. 2013;122(24):3899-907.
4. Mullighan CG. Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. 2013;50(4):314-24.
5. Fielding AK, Richards SM, Chopra R, Lazarus HM, Litzow MR, Buck G, et al. Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. *Blood*. 2007;109(3):944-50.
6. Tavernier E, Boiron JM, Huguet F, Bradstock K, Vey N, Kovacs T, et al. Outcome of treatment after first relapse in adults with acute lymphoblastic leukemia initially treated by the LALA-94 trial. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* 2007;21(9):1907-14.
7. Oriol A, Vives S, Hernandez-Rivas JM, Tormo M, Heras I, Rivas C, et al. Outcome after relapse of acute lymphoblastic leukemia in adult patients included in four consecutive risk-adapted trials by the PETHEMA Study Group. *Haematologica*. 2010;95(4):589-96.
8. Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, Dudley ME, Stetler-Stevenson M, Feldman SA, et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood*. 2010;116(20):4099-102.
9. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2011;365(8):725-33.
10. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*. 2013;5(177):177ra38.
11. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(16):1509-18.
12. Maude SL, Teachey DT, Porter DL, Grupp SA. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015;125(26):4017-23.
13. Park JH, Geyer MB, Brentjens RJ. CD19-targeted CAR T-cell therapeutics for hematologic malignancies: interpreting clinical outcomes to date. *Blood*. 2016;127(26):3312-20.
14. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2015;385(9967):517-28.
15. Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, Somerville RP, Carpenter RO, Stetler-Stevenson M, et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Clin Oncol*. 2015;33(6):540-9.
16. Kebriaei P, Singh H, Huls MH, Figliola MJ, Bassett R, Olivares S, et al. Phase I trials using Sleeping Beauty to generate CD19-specific CAR T cells. *J. Clin. Invest*. 2016;126(9):3363-76.

## Ejemplos

Ejemplo 1: proliferación de células inactivadas TCR-alfa expresantes de CAR-CD22.

Se diseñaron y produjeron dos secuencias (denominadas «medio dianas») de 17 pb de longitud heterodiméricas con diana en nucleasa TALE separadas por un espaciador de 15 pb en el gen de la región de cadena constante de receptor alfa de células T (TRAC). Cada media diana es reconocida por repeticiones de las seminucleasas TALE enumeradas en la Tabla 6.

Tabla 6: nucleasas TAL con diana en el gen de TCR-alfa

Diana	Secuencia diana	Secuencia repetida	Seminucleasa TALE
TRAC_T01	TTGTCCACAGATATCC Agaacctgacctg CCGTGTACCAGCTGAGA (SEC ID n.º 18)	TRAC_T01-L repetido	TALEN TRAC_T01-L (SEC ID n.º 16)
		TRAC_T01- R repetido	TALEN TRAC_T01-R (SEC ID n.º 17)

Cada constructo de nucleasa TALE se subclonó utilizando la digestión con enzima de restricción en un vector de expresión de mamífero bajo el control del promotor de T7. Se sintetizó ARNm codificante de la nucleasa TALE de corte de la secuencia genómica TRAC a partir del plásmido portador de la secuencia codificante cadena abajo del promotor de T7.

Se transfectaron células T purificadas preactivadas durante 72 horas con perlas recubiertas con anti-CD3/CD28, con cada uno de los 2 ARNm codificantes de ambas seminucleasas TRAC\_T01 TALE. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se transdujeron respectivamente diferentes grupos de células T del mismo donante con un vector codificante de uno de los CAR CD22 de la invención. Dos días después de la transducción, se purificaron células CD3<sup>NEG</sup> utilizando perlas magnéticas anti-CD3 y 5 días después de la transducción se reactivaron las células con anti-CD28 soluble (5 µg/ml).

Se realizó un seguimiento de la proliferación celular durante hasta 30 días tras la reactivación mediante el recuento celular 2 veces a la semana. La proliferación en células con inactivación de TCR-alfa expresantes de CAR CD22 era comparable a la de células no inactivadas y se incrementó especialmente al reactivarlas con anti-CD28.

#### Transfección múltiple de ARNm de TALEN

Los ARNm codificantes de los TALEN TRAC (izquierda y derecha) y ARNm codificantes de parejas de TALEN específicos para el gen B2M se transfectaron en células T activadas y posteriormente se transdujeron con polinucleótidos exógenos codificantes de un CAR específico para CD22 o un CAR específico para CD19 o ambos.

Las células con doble inactivación, de los genes TRAC y B2M o CD56, expresaron un nivel indetectable de TCR y CHMI o TCR y CD56. Tras la purificación, las células se transdujeron nuevamente.

#### Ejemplo 2: Células T CAR CD22

Desarrollo de células T CAR modificadas con diana en CD22, para el tratamiento de LLA o LLC refractaria, recidivante o agresiva.

- CAR de CD22: (Figura 2)
- Constructo como m971 y variantes de m971 con afinidad reducida para CD22 y elevada selectividad

Se diseñaron y prepararon CAR CD22 utilizando diferentes scfv. El scfv m971 se derivó del anticuerpo 971 (Haso W1, Lee DW, Shah NN, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Pastan IH, Dimitrov DS, Morgan RA, FitzGerald DJ, Barrett DM, Wayne AS, Mackall CL, Orentas RJ. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood. 14 de febrero de 2013;121(7):1165-74. doi: 10.1182/blood-2012-06-438002. pub. electr.: 14 de dic. de 2012).

Se construyó una arquitectura de CAR (figura 2) con el dominio coestimulador de 41BB, el dominio de activación CD3ζ, el dominio transmembranal CD8α y una bisagra, la bisagra CD8α (SEC ID n.º 15). La construcción que comprendía un FcγRIIIα- bisagra corresponde a SEC ID n.º 14.

Se insertaron los constructos en un vector para la expresión estable y el cribado de los CAR diseñados.

Los CAR CD22 eran CAR m971-V3 (SEC ID n.º 22) y SEC ID n.º 24.

Las secuencias también pueden optimizarse para la unión de CD22 y el tratamiento de LLA y LLC, preferentemente sus formas refractarias-recidivantes y agresivas.

• *Expresión de CAR*

Se introdujeron CAR CD22 en células T KO TCR primarias 5 días después de la activación con perlas recubiertas con anti-CD3CD28 e IL-2. Se evaluó la expresión de CAR mediante citometría de flujo. Todos los CAR se expresaron en la superficie celular. Actividad hacia las líneas celulares transformadas CD22<sup>+</sup> y LLA B CD22<sup>+</sup> refractario o recidivante de pacientes.

Para someter a ensayo la funcionalidad de los CAR anti-CD22, células B expresantes de CD22 (se utilizaron las líneas de LLA: REH, SEM, NALM6-GL, KOPN8, Daudi, Raji y K562 (ver Haso et al., 2013, 2013; Blood: 121 (7) : 1165-1174 para datos experimentales). Se obtuvieron LLA B CD22<sup>+</sup> refractario o recidivante de pacientes.

Tal como se esperaba, las células expresantes de CD22 se tiñeron positivamente y fueron la diana de CAR CD22 de m971 de la invención, igual que con el CAR CD22 (scfv2 de HA22).

*Ensayo de degranulación*

Para validar los constructos de CAR CD22, se llevó a cabo un ensayo de degranulación en células diana, en donde las células T expresaban el CAR CD22 de la invención. Se evaluó la degranulación de CART mediante citometría de flujo. La lectura era la expresión de CD107A en la membrana plasmática de las células T tras 5 horas de incubación con las células diana. Los resultados mostraron que la degranulación era más importante de las células T CARm971- (scfv-1) que de las CAR CD22 contra la parte distal del scfv-2 de CD22 (SEC ID n.º 20) (figura 5).

• *Ensayo de citotoxicidad*

Se llevó a cabo un ensayo de citotoxicidad en estas mismas células diana con células T que expresaban CAR CD22 de la invención. Los CAR CD22 mostraron una fuerte lisis específica de las células CD22 de UCART22 de la invención en comparación con las células expresantes de un scfv contra la parte distal de CD22 (scfv2) (figura 6).

*Ensayo de interferón gamma*

Producción de interferón gamma de UCART22 (scfv-V1 contra el dominio proximal de CD22) en comparación con la de células T no transducidas (NT) con un CAR con diana en la parte distal de las células CD22(scfv-V2) en la presencia de células NALM-16 positivas con CD22 en comparación con células SUP-T1 negativas para CD22 (figura 7).

*Supervivencia de los ratones*

La supervivencia de los ratones mejoró en la presencia de UCART22 (scfv-V1 contra el dominio proximal de CD22) o CART22 (ninguna inactivación de TRAC) en comparación con células de control (figura 8).

*Resistencia a hipoxia y/o fármacos*

Las células modificadas UCART22 de la invención no resultaron significativamente afectadas (supervivencia y actividad de CTL) en la presencia de alemtuzumab (50 microgramos/ml) o APN (gripe) en comparación con las células no modificadas sensibles, que murieron 48 horas después de la adición del fármaco al cultivo celular, o la condición de cultivo de hipoxia (menos de 5 %, preferentemente menos de 1 % de O<sub>2</sub>).

Los ensayos realizados bajo condiciones pobres en O<sub>2</sub> (<5 % o <1 %) generaron resultados similares y confirmaron que UCART22 con expresión incrementada de HIF-1a pueden sobrevivir, expresar CAR CD22 y estar activas bajo hipoxia.

Se obtuvieron resultados similares (supervivencia, actividad de CTL) en ratones tratados con Campath (50 microgramos/ml), confirmando la resistencia de UCART22 a los fármacos. Se sugiere la posibilidad de que las células UCART22 de la invención alcanzan las células cancerosas anidadas en tejidos o que alcanzan las células cancerosas que forman agregados *in vivo*, ya que la cantidad de células cancerosas que se «recuperaban» o que «escapaban» al tratamiento con UCART22 era mucho menor (reducción de aproximadamente 15 %) que en ratones tratados con UCART22 no resistentes a O<sub>2</sub>. Por lo tanto, aparentemente una hipoxia local creada por tumores líquidos puede impedir que las células inmunitarias los combatan.

Se llevaron a cabo experimentos para determinar si las células UCART22 podrían eliminarse si y cuando se desee (figuras 3 y 4). En ratones, el rituximab indujo una reducción significativa en UCART, tal como sugiere una intensidad de fluorescencia incrementada de las células tumorales en los ratones tratados con rituximab y UCART, en comparación con las células solas.

Los primeros datos clínicos obtenidos muestran que las células T UCAR redujeron significativamente la LLA recidivante y refractaria *in vivo* e *in vitro*, con una EICH nula o muy suave (grado 1) y una tormenta de citoquinas suave a no incontrolada.

Dicho tratamiento es menos «tóxico» que las células T CAR CD22 autólogas y puede controlarse en el paciente utilizando rituximab y/o QBEN10.

- 5 Las células persisten en el ser humano durante suficiente tiempo para ser activas (durante un mes) y puede reducirse su número utilizando QBEN10.

*Ejemplos de secuencias polipeptídicas de CAR CD22 preparadas*

- 10 Las secuencias enmarcadas corresponden a las secuencias de VH y VL preferentes. VH y VL pueden intercambiarse (modificación en los puntos calientes) para mejorar la eficiencia de CAR tal como se ha indicado anteriormente.

- v1-m972 (FcγRIIIα-CD8α<sup>TM</sup>-41BB.IC-CD3ζ.IC) (Control no parte de la invención)

MALPVTALLPLALLHAARP--  
 EVQLVQSGGGVVRPGGSLRLPCAASGFTDDYGMSSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADS  
 VKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCARGGDDAFDIWGQGTMTVTVSS —  
 GGGGSGGGGSGGGGS—  
 RIVMTQSPGTLSVSPGETATLSCRASQSFNMLAWYQQKSGQPPRLIYGVSTRAAGVPAFSGSG  
 SGTEFTLTISNLQSEDAVYYCQQYGDWPRYTFGQGTKVERK --  
 GLAVSTISSFFPPGYQIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC  
 RFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN  
 15 PQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

- V3-m972 (CD8α-CD8α<sup>TM</sup>-41BB.IC-CD3ζ.IC) (control no parte de la invención)

MALPVTALLPLALLHAARP--  
 EVQLVQSGGGVVRPGGSLRLPCAASGFTDDYGMSSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADS  
 VKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCARGGDDAFDIWGQGTMTVTVSS—  
 GGGGSGGGGSGGGGS—  
 RIVMTQSPGTLSVSPGETATLSCRASQSFNMLAWYQQKSGQPPRLIYGVSTRAAGVPAFSGSG  
 20 SGTEFTLTISNLQSEDAVYYCQQYGDWPRYTFGQGTKVERK—  
 TTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC  
 KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL  
 NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG  
 LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

- v1-m971 (FcγRIIIα-CD8α<sup>TM</sup>-41BB.IC-CD3ζ.IC)

MALPVTALLPLALLHAARP--  
 QVQLQQSGPGLVKPSQTLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAV  
 SVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMTVTVSS —  
 GGGGSGGGGSGGGGS—  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGS  
 GTDFTLTISLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFGQGTKLEIK —  
 GLAVSTISSFFPPGYQIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC  
 RFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN  
 25 PQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

- v3-m971 (CD8α-CD8α<sup>TM</sup>-41BB.IC-CD3ζ.IC)

MALPVTALLPLALLHAARP--  
 QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAV  
 SVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMTVTSS—  
 GGGGSGGGGSGGGGS—  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGS  
 GTDFTLTISLQAEDFATYYCQQSYISIPQTFGQGTKLEIK—  
 TTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYC  
 KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL  
 NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG  
 LYQGLSTATKDTYDALHMQALPP

## RESULTADOS:

El constructo de CAR seleccionado para la preparación en UCART22 comprende el scFv anti-CD22 humano de m971 (descrito en Haso et al., 2013), una bisagra CD8 $\alpha$  (opcional) y dominio transmembranal, y una cola citoplasmática compuesta de dominio coestimulador de 4-1BB y dominio de señalización CD3 $\zeta$  (figura 3).

Otro constructo de CAR comprendía sucesivamente una secuencia de scFv anti-CD22 humano de m971, dos dominios de unión para rituximab (CD20), una bisagra CD8 $\alpha$  y dominio transmembranal, y una cola citoplasmática compuesta de dominio coestimulador de 4-1BB y dominio de señalización CD3 $\zeta$  (figura 3).

Un constructo de CAR alternativo comprendía sucesivamente un dominio de unión para rituximab (CD20), un dominio de unión para Q-B3N10 (CD34), el scFv anti-CD22 humano de m971, dos dominios de unión para rituximab (CD20), una bisagra CD8 $\alpha$  y dominio transmembranal, y una cola citoplasmática compuesta de dominio coestimulador de 4-1BB y dominio de señalización CD3 $\zeta$  (figura 3).

En UCART22, se utilizó un vector lentivírico recombinante (LVr) de tercera generación autoinactivante (SIN, por sus siglas en inglés) para generar células T que expresaban CAR anti-CD22 y el mecanismo de agotamiento de RQR8 bajo el control del promotor EF1 $\alpha$  humano (figura 4). Los vectores lentivíricos recombinantes derivados del VIH son genéticamente estables y todavía no han mostrado pruebas de consecuencias patológicas atribuidas al vector (Chang y Sadelain, 2007; Wang et al., 2009). Además, las condiciones para la transducción de células T con LVr son conocidas y son compatibles con la conservación de las propiedades funcionales de las células T.

En UCART22, puede utilizarse el vector VAA6 tras la edición génica de un gen tal como el gen de TRAC (gen codificante de la subunidad alfa o el TCR) o cualquier gen dado a conocer en el documento n.º PCT/EP2017/076798 (figura 9). También se prepararon variantes de constructo de CAR anti-CD22 de la invención que comprendía un scfv de CD19 adicional (antes o después de scfv CD22), así como un CAR CD22 multicadena,; también se construyó un CAR CD19, CD22 multicadena (figura 2) y se insertó en vector lentivírico/virus adenoasociado 6 (VAA6), permitiendo la inserción de los constructos de CAR CD22 o constructos de CAR CD19 descritos posteriormente, en el gen TRAC o en el gen CD25, o en el gen microglobulina beta-2 (la secuencia de CAR estaba flanqueada 5' y 3' por secuencias que permitían la recombinación homóloga en el gen TRAC, en el gen CD25 o en el gen microglobulina beta-2 después del corte específico de dicho gen utilizando una proteína TAL-Fok-1 específica (TALEN).

Se preparó un UCART22 que comprendía además un gen KO de receptor de TGF-beta, un gen KO de receptor de IL-10, un gen KO de AHR, un gen KO de PD1, un gen KO de LAG-3, un gen KO de TIM-3 o una combinación de los mismos.

Se preparó un ejemplo de cada UCART22 que comprendía además un gen KO de receptor de TGF-beta, un gen KO de receptor de IL-10, o un gen KO de receptor de hidrocarburo arilo (AHR), o un gen KO de PD1, o un gen KO de LAG-3, o un gen KO de TIM-3.

Con el fin de someter a ensayo el efecto de agotamiento de las células cancerosas CD19<sup>+</sup> CD22<sup>+</sup>, también se preparó el constructo anti-CD19 previamente descrito en "Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells". Waseem Qasim, et al., 2017. Science Translational Medicine, 25 de enero de 2017), y que comprendía, además, un gen suicida distinto de los portados por CAR CD22 (tal como se describen en el documento n.º WO2016120216A1). En el presente estudio, se midió la actividad citolítica de:

- 1) una combinación de UCART19 + UCART22 (dos CAR de cadena sencilla), en comparación con células individuales por sí solas (todas a una concentración de 5x10<sup>6</sup> células),



- 2) células negativas para TCR expresantes de un CAR biespecífico anti-CD22 anti-CD19 (un CAR de cadena sencilla biespecífico), en comparación con células individuales por sí solas (todas a una concentración de  $5 \times 10^6$  células),
- 3) o un CAR multicadena que comprendía tanto scfv de CD22 y CD19 como scfv CD19 CD22,

en comparación con las células individuales por sí solas (todas a una concentración de  $5 \times 10^6$  células).

#### *Expresión de RQR8, R2CD22CAR o QR3CD22CAR para conferir sensibilidad al rituximab/rituximab+QBEN10*

El casete de vector lentivírico que controla la expresión de CAR CD22 ha sido diseñado para coexpresar RQR8 (mediante un conector peptídico 2A). RQR8 es un ligando de depleción que potencialmente puede ser activado en el caso de acontecimientos adversos no controlables relacionados con la administración de UCART22. RQR8 es una proteína de superficie celular artificial de 136 aminoácidos que combina epítomos de unión a anticuerpo procedentes de CD34 humano, reconocidos por el anticuerpo QBEnd-10, y CD20 humano (Philip et al., 2014). Los epítomos de CD20 presentes dentro del constructo son reconocidos por el rituximab, permitiendo de esta manera la delección de las células expresantes de RQR8 mediante la eliminación celular mediada por el complemento (CDC, por sus siglas en inglés) y mediante citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) en la presencia de rituximab y/o QBEN10.

En otros experimentos, los constructos correspondientes a un CAR anti-CD22 que comprenden 2 epítomos reconocidos por rituximab (R) (CAR CD22 R2: dos epítomos reconocidos por rituximab, insertados inmediatamente después de scfv e inmediatamente antes de la bisagra, o en lugar de la bisagra para acortar el dominio extracelular en comparación con la construcción completa con bisagra) o un CAR CD22 QR3 «QR3» (Q: epítomo reconocido por QBEN10, Q-R- en extremo N-terminal antes de VH-conector-VL, RR bisagra TM-41BB-CD3-zeta), se prepararon y sometieron a ensayo frente a células que expresaban diversos niveles de CD22.

#### *Inactivación del gen TRAC para limitar la alorreactividad de UCART22*

Una limitación potencial de los enfoques de inmunoterapia adoptiva alogénica es que el reconocimiento de las disparidades del CHM entre donante y receptor a través del complejo TCR $\alpha\beta$  de las células del donante puede conducir a la activación/proliferación de las células T del donante y al desarrollo de enfermedad del injerto contra el huésped (EICH). TCR $\alpha\beta$  está compuesto de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , con el TCR $\alpha$  codificado por un único gen y TCR $\beta$  por dos genes homólogos.

Las células UCART22 son modificadas genéticamente para interrumpir específicamente el gen constante alfa del receptor de células T (TRAC). La inactivación del gen TRAC evita la expresión en superficie celular del complejo TCR $\alpha\beta$ , eliminando el reconocimiento mediado por TCR de los antígenos de histocompatibilidad que pueden conducir a EICH. Al final del procedimiento de preparación de UCART22, las células TCR $\alpha\beta^+$  restantes se agotan, garantizando un nivel residual  $\leq 3,0$  % de células TCR $\alpha\beta^+$  en el producto final, según los criterios de liberación.

#### *Inactivación del gen de CD52 para conferir resistencia al alemtuzumab*

Se han modificado las UCART22 para que sean una mezcla de células CD52 $^-$  y CD52 $^+$ , permitiendo el uso potencial del alemtuzumab en el régimen de linfodepleción antes de la administración de las UCART22. El alemtuzumab es un anticuerpo monoclonal que se une a CD52 humano. La fracción CD52 $^-$  de las UCART22, de esta manera, es resistente al alemtuzumab.

Se utiliza la tecnología TALEN<sup>®</sup> para interrumpir tanto el gen TRAC como el CD52. En el procedimiento de producción de UCART22, se introducen TRAC y TALEN<sup>®</sup> CD52 en las células en forma de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) utilizando un sistema de electroporación. Esta expresión transitoria permite que TALEN<sup>®</sup> realice una inactivación génica dirigida eficiente antes de ser degradado por las células. Este enfoque evita los riesgos potenciales asociados a la expresión a largo plazo de las nucleasas en las células inyectadas en el paciente.

#### *Inactivación del gen B2M para limitar la alorreactividad de UCART22*

Se utiliza la tecnología TALEN<sup>®</sup> para interrumpir tanto el gen TRAC como el gen B2M. En el procedimiento de producción de UCART22, se introducen TRAC y TALEN<sup>®</sup> B2M en las células en forma de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) utilizando un sistema de electroporación. Esta expresión transitoria permite que TALEN<sup>®</sup> realice una inactivación génica dirigida eficiente antes de ser degradado por las células.

## **Ejemplos**

#### *Fuentes de células T utilizadas en estudios no clínicos (farmacológicos y toxicológicos)*

Se resume en la Tabla C una descripción de los productos celulares utilizados en los estudios no clínicos.

Tabla C. Células T modificadas utilizadas en estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo*.

Células	Descripción	Proceso	Observaciones
células T NTD	células T no transducidas	- No transducidas - No electroporadas	células T no modificadas
células T DKO NTD	células T doble KO no transducidas	- No transducidas - electroporación de ARNm de TRAC y TALEN® CD52 - Purificación de células TCRαβ	células T TCRαβ-CD52 no transducidas
células T DKO NTD	células T doble KO no transducidas	- No transducidas - electroporación de ARNm de TRAC y TALEN® B2M - Purificación de células TCRαβ	Células T TCRotp-CHMI no transducidas
Células UCART22	células T doble KO transducidas	- Transducción de VL-RQR8-2A-CAR CD22 - electroporación de ARNm de TRAC y TALEN® CD52 - Purificación de células TCRαβ	TCRotp-CD52-transducidas con VLr codificante de CD22CAR y RQR8 y purificadas para células deficientes en TCRαβ
Células UCART22	células T doble KO transducidas	- Transducción de CD22CAR - electroporación de ARNm de TRAC y TALEN® b2M - Purificación de células TCRαβ	TCRotp-CHMI- transducidas con el VAA6 codificante de CAR CD22 (R2) o VAA6 codificante de CAR CD22 CD19 y purificadas para células deficientes en TCRαβ
Células UCART22/19	células T doble KO transducidas	- transducción de CAR CD22 CD19 - electroporación de ARNm de TRAC y TALEN® b2M - Purificación de células TCRαβ	TCRαβ-CHMI- transducidas con el VAA6 codificante de CAR CD22 CD19 y RQR8 y purificadas para células deficientes en TCRαβ.
DKO: doble KO, KO: inactivación génica (en inglés, «knock-out»), VLr: vector lentivírico recombinante CHMI: complejo mayor de histocompatibilidad de clase I B2m: microglobulina beta-2			

### Resumen

La activación de las UCART22 está controlada por el contacto entre el receptor de antígeno quimérico anti-CD22 (CAR CD22) y el antígeno CD22, conduciendo a la destrucción de las células de LLA-B CD22<sup>+</sup> mediante citotoxicidad mediada por células T y potencialmente la producción de citoquinas proinflamatorias.

Los estudios de prueba de concepto realizados durante el desarrollo de otros productos de UCART (UCART19 y UCART123) demostraron que las células UCART (células T CAR deficientes en TCRαβ) son tan activas como las células T CAR no editadas génicamente (células T CAR positivas para TCRαβ) *in vitro* e *in vivo* en modelos de xenoinjerto tumoral en ratones NSG (Poirot et al., 2015). Lo anterior se verificó para células T CAR CD22 deficientes en TCRαβ y para células T CAR CD22 deficientes en CHMI y deficientes en TCRαβ, en comparación con células T CAR CD22 positivas para TCRαβ.

En la Tabla 2 se resumen estudios de farmacología *in vitro* realizados durante el desarrollo no clínico de UCART22. Los estudios han demostrado:

- La actividad antitumoral de UCART22 mediante citotoxicidad dependiente de antígeno CD22 y ensayos de secreción de citoquinas. Se llevaron a cabo ensayos de actividad contra líneas celulares de LLA-B y muestras de LLA-B primario.
- El TALEN® eficiente medió en la inactivación de los genes TRAC y CD52.
- El TALEN® eficiente medió en la inactivación de los genes TRAC y microglobulina beta-2.
- Las células T CD52 son resistentes al alemtuzumab.

- La eliminación eficiente de células RQR8<sup>+</sup> o células positivas para CAR CD22 R2 utilizando rituximab.

Tabla D. Lista de estudios de farmacología *in vitro*.

Estudio	Método	Células	BPL	Resultados
Farmacología primaria				
Ensayo de citotoxicidad	Citometría de flujo	UCART22	No	Ensayos de citotoxicidad utilizando células CD22 <sup>+</sup> (líneas celulares de LLA-B o muestras primarias de LLA-B) mostraron la eliminación de células específicas CD22 por las células UCART22.
		GMP UCART22	Sí	Ensayo de citotoxicidad contra una línea celular tumoral CD22 <sup>+</sup> se realizará en todos los lotes de GMP.
Ensayo de secreción de citoquinas	ELISA/ citometría de flujo	UCART22	No	Las células UCART22 secretan específicamente IFN $\gamma$ en presencia de células tumorales CD22 <sup>+</sup> (líneas celulares LLA-B o muestras primarias de LLA-B).
		GMP UCART22	Sí	Se realizará un ensayo de secreción de citoquinas contra una línea celular tumoral CD22 <sup>+</sup> en todos los lotes de BPF.

Farmacología secundaria				
Inactivación molecular de los genes TRAC y CD52	Secuenciación de alto rendimiento de los loci TRAC y CD52	Células T transfectadas con ARNm codificante de TALEN <sup>®</sup> TRAC y CD52 (ARNm de grado BPF).	No	La secuenciación de alto rendimiento de los loci TRAC y CD52 en células T tratadas con TALEN <sup>®</sup> mostró niveles elevados de modificaciones específicas de sitio en los loci TRAC y CD52.
Inactivación funcional del TCR $\alpha\beta$	Análisis de citometría de flujo	UCART22	No	Ausencia de regulación positiva de marcadores de activación de CD25 y CD69 en UCART22 tras la estimulación de TCR mediada por PHA.
Resistencia a células CD8 <sup>+</sup>	Ensayos citolíticos	Células T tratadas con TALEN <sup>®</sup> B2M+TRAC	No	Las células T que contienen gen beta2M e inactivación de TRAC no resultan eliminadas en la presencia de células T CD8 <sup>+</sup> .
Resistencia al alemtuzumab de las células CD52 <sup>+</sup>	Ensayos de CDC	Células T tratadas con TALEN <sup>®</sup> CD52	No	Las células T que contienen una inactivación de gen CD52 no resultan eliminadas en la presencia de tanto alemtuzumab como complemento en ensayos de CDC.
Sensibilidad de UCART22 al rituximab	Ensayo de CDC	UCART22 (lotes de desarrollo)	No	Las células UCART22 resultan eliminadas en la presencia de tanto rituximab como complemento en ensayo de CDC.
CDC=citotoxicidad dependiente del complemento. PHA=fitohemaglutinina.				

Los estudios farmacológicos *in vivo* (resumidos en la Tabla E) han demostrado:

- la actividad antitumoral de UCART22 *in vivo* contra xenoinjertos tumorales en ratones inmunodeficientes utilizando una línea celular de LLA-B. La actividad *in vivo* de UCART22 fabricadas bajo condiciones BFP se confirmó contra una línea celular de LLA-B.
- La actividad antitumoral mejorada de UCART22/19 *in vivo* contra xenoinjertos tumorales en ratones inmunodeficientes utilizando una línea celular de LLA-B. La actividad *in vivo* de UCART22 /19 y 19/22 fabricadas bajo condiciones BFP contra una línea celular de LLA-B.
- La capacidad del rituximab de eliminar las células RQR8<sup>+</sup> en un modelo de ratón inmunocompetente.

Tabla E. Lista de estudios *in vivo*.

Estudio	Células	Modelo animal	Modelo tumoral	Estudio de BPL	Resultados
Farmacología primaria					
Actividad antitumoral de UCART22	UCART22	Modelo de xenoinjerto tumoral en ratones NSG	Línea celular de LLA-B (Daudi)	No	Estudios <i>in vivo</i> realizados para demostrar la actividad antitumoral de UCART22 contra una línea celular de LLA-B. Lectura: - carga tumoral (mediante captación de imágenes bioluminiscentes <i>in vivo</i> ) - supervivencia de los ratones
	GMP UCART22			análogas a BPL	Se está realizando un estudio confirmatorio con UCART22 BPF para demostrar la actividad <i>in vivo</i> .
Farmacología secundaria					
Sensibilidad de las células RQR8 <sup>+</sup> al rituximab.	Esplenocitos de ratón transducidos con un retrovirus codificante del constructo CAR RQR8-2A-CD19.	Ratones C57BL/6 x Balb/c (F1)		No	Estudio POC que demuestra la depleción eficiente inducida por rituximab de células RQR8 <sup>+</sup> en sangre, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos. Estudio publicado como Philip et al., 2014.

Para demostrar la actividad de las células UCART22, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad controlada por CAR y de secreción de citoquinas contra líneas celulares tumorales y células de LLA-B primario.

Se evaluó la actividad de UCART22 mediante ensayos de citotoxicidad.

*Actividad citotóxica contra líneas celulares de LLA-B.*

Se evaluó la potencial citotoxicidad de UCART22 contra varias líneas celulares tumorales derivadas de pacientes infantiles o adultos de LLA-B (Tabla F). Los resultados muestran que MHH-CALL-4, MUTZ-5, SEMK2, PALL-2, LAX2, BALL-1, NALM-6 y RS4;11 son todas líneas celulares CD22<sup>+</sup> que expresan diferentes niveles de CD22. Como controles negativos se utilizaron dos líneas celulares de leucemia mieloide aguda (LMA) (OCI-AML2 y MOLM13), que no expresan CD22.

Tabla F. Características de las líneas celulares.

Línea celular	Proveedor	Referencia	Tipo de enfermedad	Expresión de CD22
BALL-1	DSMZ	ACC 742	LLA-B (cariotipo complejo)	+
LAX2	M. Muschen		LLA-B (positivo para Ph)	+
MHH-CALL-4	DSMZ	ACC 337	LLA-B (tipo Ph)	+
MUTZ-5	DSMZ	ACC 490	LLA-B (tipo Ph)	+
NALM-6	ATCC	CRL-3273	LLA-B (t(5;12))	+
PALL-2	JCRB	JCRB1345	LLA-B (positivo para Ph)	+
RS4;11	ATCC	CRL-1873	LLA-B (t(4;11) e hiperdiploide)	+
SEMK2	DSMZ	ACC 546	LLA-B (t(4;11))	+
MOLM13	DSMZ	ACC 554	LMA	-
OCI-AML2	DSMZ	ACC 99	LMA	-

Se evaluó la citotoxicidad específica de UCART22 contra las células CD22<sup>+</sup> mediante medición de la viabilidad de las células diana CD22<sup>+</sup> tras el cocultivo con células UCART22. Se utilizaron células T doble KO TRAC y CD52 no transducidas (CAR<sup>-</sup>) como control para calcular el porcentaje de lisis celular específica de las células de LLA-B CD22<sup>+</sup> diana por UCART22. Los resultados muestran la actividad citotóxica de las células UCART22 contra un panel de células tumorales de LLA-B CD22<sup>+</sup>. UCART22 muestra actividad de lisis celular específica contra todas las líneas celulares que expresan CD22, incluso a los niveles más bajos.

#### Actividad citotóxica contra muestras de LLA-B primario.

Se confirmó la actividad citotóxica de UCART22 contra varias muestras de LLA-B primario. Las características de las muestras primarias se presentan en la Tabla G. Solo las muestras de pacientes con más de 50 % de blastos fueron utilizadas para los estudios de coincubación, que constituyeron 14 de las 19 muestras.

Tabla G. Muestras de LLA primario evaluadas en estudios preclínicos. ND: no determinado.

ID	Nombre	Edad/Sexo	Anormalidades citogenéticas	Mutaciones	Estado clínico	% Blastos	% Blastos CD22 <sup>+</sup>
Pt1	PB6265310	24/M	CRLF2+ Y PH+	JAK2R683G, EZH2	Diagnóstico	84	ND
Pt2	PB6296870	69/F	LLA tipo Ph (CRLF2+)	TP53	Diagnóstico	17	92.3
Pt3	PB3882028	29/M	LLA tipo Ph (CRLF2+)	Sin mutaciones	Recaida	32	58.7
Pt4	PB6232236	21/M	Tipo Ph (IGH-CRLF2)	JAK2R683S	Recaida	65	94.7
Pt5	PB6304576	68/M	NO CRLF2+ NO Ph+	TP53, IDH2	Diagnóstico	69	25.7
Pt6	PB6352880	81/M	LLA PH+	Sin mutaciones	Diagnóstico	48	86.5
Pt7	PB6351838	56/F	LLA PH+	Sin mutaciones	Diagnóstico	68	90.2
Pt9	PB6268010	21/M	NO CRLF2+, NO Ph+, trisomía 4	Sin mutaciones	Diagnóstico	60	92.0
Pt10	BM6301348	69/F	LLA tipo Ph (CRLF2+)	NRAS, EZH2	Recaida	93	84.3
Pt11a	PB6301394-1	55/F	LLA tipo Ph (CRLF2+)	Sin mutaciones	Diagnóstico	75	89.7
Pt11b	BM6301394-2	55/F	LLA tipo Ph (CRLF2+)	Sin mutaciones	Diagnóstico	91	98.1
Pt12	PB6300308	22/M	LLA Ph+	Sin mutaciones	Diagnóstico	79	47.2
Pt13	PB6124238	33/M	t(4;11)	TP53	Recaida	59	80.2
Pt14	PB6309102	54/F	LLA Ph+	Sin mutaciones	Diagnóstico	23	83.8
Pt15	PB6269878	68/M	complejo hipodiploide cito	Sin mutaciones	Diagnóstico	67	67
Pt16	PB6229772	70/M	Complejo	TP53	Recaida	51	51
Pt17	BM3748646	39/M	tipo Ph	NO REALIZADO	Diagnóstico	90	90
Pt18	BM2820966	65/F	Tipo Ph (IGH-CRLF2)	deleción de IKZF1	Diagnóstico	92	92
Pt19	BM4198594	21/M	tipo Ph (IGH-CRLF2+BCR-ABL1)	CRLF2_F232C, ITPKB_P167R, ITPKB_S925G, PTPN11	Recaida	82.5	82.5

También se evaluó el nivel de expresión de CD22 y CD19 en todas las muestras de LLA-B primario excepto Pt1. Once presentaron un nivel de expresión superficial de CD22 superior al de los controles CD22<sup>-</sup> y 4 muestras de paciente de LLA-B mostraron una expresión en superficie de CD22 en el intervalo observado en las líneas celulares de LLA-B (>1000 moléculas de CD22/célula). Las células con alta expresión de CD22 (>60 %) también expresaron CD19, excepto en dos muestras de recaída.

Utilizando el mismo enfoque que para las líneas celulares, se confirmó la actividad CTL contra las 8 muestras de paciente de LLA-B (lisis celular específica superior a 10 %).

#### *Ensayo de secreción de citoquinas contra las líneas celulares de LLA-B y muestras de LLA-B primario.*

Se evaluó la liberación de interferón-gamma (IFN $\gamma$ ) y de otras citoquinas por células UCART22 coincubadas con varias líneas celulares o muestras de paciente de LLA-B utilizando el ensayo de citoquinas BioLegend Legend PLEX 13. Se observó que IFN $\gamma$  presentaba la concentración más alta de todas las citoquinas detectadas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 y factor alfa de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ )) secretado al medio tras una coincubación de 25 horas entre las células LLA-B y UCART22 o las células T de control (DKO NTD).

Se observó un nivel elevado de secreción de IFN $\gamma$  al coincubar UCART22 con tanto líneas celulares de LLA-B como muestras de LLA-B primario.

#### *Estudios in vitro secundarios*

Inactivación inducida por TALEN<sup>®</sup> de los genes TRAC, B2M y CD52

La capacidad de utilizar UCART22 en un contexto alogénico depende de la capacidad de evitar la expresión en superficie celular de TCR $\alpha\beta$ , CHM CI, eliminando el reconocimiento mediado por TCR de los antígenos de histocompatibilidad que pueden conducir a EICH y al ataque por las células CD8<sup>+</sup> del huésped. Con el fin de eliminar eficazmente TCR $\alpha\beta$  y CHM CI de la superficie celular, se ha utilizado la edición génica mediada por TALEN<sup>®</sup> para inactivar el gen TRAC y el gen de la microglobulina beta-2 (B2M). Además, se ha utilizado otro TALEN<sup>®</sup> durante el procedimiento de preparación de las UCART22 para inactivar el gen CD52, permitiendo el uso del alemtuzumab en el régimen de acondicionamiento de linfodepleción. En contextos particulares, se utilizó TALEN<sup>®</sup> durante el procedimiento de preparación de las UCART22 para inactivar el gen de la microglobulina beta-2 (B2M) para alterar la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CHM clase I) y para prevenir el rechazo por las células T del huésped.

#### *Análisis molecular de la disrupción génica de los genes TRAC, CD52 y B2M.*

Para demostrar las modificaciones dirigidas de los genes TRAC y CD52 a un nivel molecular, se aisló ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico a partir de células T electroporadas con TRAC de grado BPF y ARNm de TALEN<sup>®</sup> CD52 o ARNm TALEN<sup>®</sup> de TRAC y B2M y se purificó para células TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> CHMCI<sup>+</sup>. Las regiones en torno a los sitios de corte de TALEN<sup>®</sup> TRAC, B2M y CD52 se amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y se analizaron mediante secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés, Illumina). En las muestras de control, se llevó a cabo el mismo análisis con células extraídas antes de la electroporación de ARNm de TALEN<sup>®</sup> (el día 6). Este análisis indicó que, aunque las células de control el día 6 no mostraban ninguna modificación en los loci TRAC y CD52, se detectó una elevada frecuencia de modificaciones en las células T tratadas con TALEN<sup>®</sup> (Tabla 6). Tabla H. Porcentaje de unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés) con el corte de TALEN<sup>®</sup> en los loci TRAC, CD52 y B2M.

Se determinaron los porcentajes mediante NGS en células T tratadas con TALEN<sup>®</sup> de 3 lotes diferentes. Se muestrearon células de control antes de la electroporación de ARNm TALEN<sup>®</sup> para todos los lotes.

Tabla H

	TRAC		CD52	B2M	
	media	SD	media SD	Media	SD
Control	0,09	0,08	0,09 0,07	0,09	0,06
TALEN	84,63	5,65	83,26 4,91	89,0	3,88

El análisis adicional de las secuencias indicó que las modificaciones inducidas por TALEN<sup>®</sup> están situadas en una región pequeña circundante al sitio diana en donde 93 % a 97 % de dichas modificaciones son deleciones. Dichas deleciones son generalmente pequeñas, de media 97 % menores de 150 pb y 81 % menores de 50 pb.

#### *Ensayo funcional que demuestra la disrupción del gen TRAC en UCART22*

Con el fin de demostrar la inactivación funcional de TCR $\alpha\beta$ , se sometieron a ensayo células UCART22 para su capacidad de expresar marcadores de activación tales como CD25 y CD69 tras la estimulación de TCR mediada por

fitohemaglutinina (PHA, por sus siglas en inglés). Se recuperaron células T UCART22, con todas las materias primas de BPF, antes (TRAC) o después (UCART22) de la depleción de las células TCRαβ<sup>+</sup>. Las células se reactivaron con 0,5 µg/ml de PHA durante 24 h. Se midió la expresión de marcadores de activación (CD25 y CD69) mediante citometría de flujo. Aunque las células TRAC de control (65,2 % TCRαβ<sup>+</sup>) regularon positivamente CD25 y CD69, no se observó ninguna regulación positiva de las células UCART22 (98,5 % TCRαβ<sup>+</sup>), confirmando la ausencia del receptor TCRαβ en UCART22.

#### *Resistencia al alemtuzumab de las células UCART22 CD52<sup>-</sup>*

La capacidad de utilizar alemtuzumab, un anticuerpo monoclonal anti-CD52, en el régimen de linfodepleción depende de la eliminación eficaz de la glucoproteína CD52 de la superficie celular de las células UCART22 para prevenir su eliminación por el alemtuzumab. De esta manera se modifican las UCART22, utilizando TALEN<sup>®</sup> CD52, para que sean una mezcla de células CD52<sup>+</sup> y CD52<sup>-</sup>. El análisis de citometría de flujo realizado con lotes de desarrollo de UCART22 al final del procedimiento de fabricación indicó que de media 72 % de las células T (células CD45<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>) eran CD52<sup>-</sup> (intervalo de 62,3 % a 76,5 %, N=6).

Para demostrar que las células CD52<sup>-</sup> son resistentes al alemtuzumab, se llevó a cabo un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las células T humanas que contenían una inactivación del gen CD52 mediada por TALEN<sup>®</sup> se trataron con 50 µg/ml de un anticuerpo anti-CD52 de rata del que se derivó el anticuerpo terapéutico alemtuzumab o inmunoglobulina G de rata (IgG) como control, con o sin complemento de conejo, durante 2 horas a 37 °C; después se analizaron mediante citometría de flujo para viabilidad y expresión de CD52.

Los resultados muestran que las células que no contienen una inactivación del gen CD52 resultan específicamente eliminadas mediante citotoxicidad dependiente del complemento en la presencia de alemtuzumab.

#### *Resistencia a células T CD8<sup>+</sup> del huésped*

Las células UCART22 deficientes en CHM clase I eran resistentes a la destrucción mediada por células T CD8<sup>+</sup>. Aunque el tratamiento de interferón-γ (IFN-γ) indujo significativamente la expresión de microglobulina β2, promoviendo la eliminación mediada por células T CD8<sup>+</sup> de las UCART22 de control.

#### *Demostración de la depleción eficaz de UCART22 tras el tratamiento con rituximab*

Las UCART22 son células T alogénicas y, de esta manera, deberían eliminarse tras la recuperación del sistema inmunitario del paciente. Además, las UCART22 se modifican para coexpresar CAR CD22 y RQR8, una proteína membranal corta que proporciona dos epítomos que se unen al rituximab (RTX), un anticuerpo monoclonal terapéutico específico para CD20 humano. Por lo tanto, RQR8 proporciona la posibilidad de reducir el número de UCART22 mediante la administración de rituximab.

Se examinó la capacidad de eliminar células UCART22 mediante citotoxicidad mediada por el complemento (CDC) tras el tratamiento con RTX. Se descongelaron UCART22 congeladas (de 5 lotes de desarrollo diferentes) y se cocultivaron con células Raji CD22<sup>+</sup> en una proporción 1:0,25 durante 3 días. Tras este periodo de reactivación, se llevó a cabo el ensayo de CDC (las células se incubaron con RTX (100 µg/ml) durante 2 horas en la presencia o ausencia de complemento de conejo neonato (BRC, por sus siglas en inglés)). Los resultados demuestran que 85 % de las células CAR<sup>+</sup> resultan eficientemente eliminadas *in vitro* en la presencia de tanto RTX como complemento.

Otro mecanismo de acción del RTX, mediante el cual puede conseguirse la depleción de las células RQR8<sup>+</sup>, es la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) (Seidel et al., 2013). En este caso, las células efectoras del sistema inmunitario (principalmente células asesinas naturales (NK)) pueden lisar activamente las células diana cuyos antígenos de superficie membranal se han unido a un anticuerpo específico.

Martin Pule en UCL ha publicado experimentos complementarios (Philip et al., 2014) que demuestran la eliminación mediada *in vitro* eficaz de las células T RQR8<sup>+</sup> mediante CDC y ADCC (células T humanas primarias transducidas con un vector retroviral bicistónico (SFG.RQR8.IRES.eGFP) codificante de RQR8 y BFP, y seleccionado con perlas QBEnd10 de Miltenyi). El curso temporal y la titulación de la dosis de RTX demostraron que la CDC es altamente eficaz a concentraciones de RTX de 25 µg/ml y superiores, produciéndose la eliminación dentro de los primeros 30 minutos. De manera similar, se ha demostrado sensibilidad mediada por ADCC en las células T RQR8<sup>+</sup>.

#### *Estudios in vivo*

##### *Justificación de la selección de especie/modelo animal*

Debido a la especificidad humana de UCART22, los estudios en modelos animales inmunocompetentes estándares no son aplicables debido al rápido reconocimiento y eliminación de las células UCART22 humanas por reacciones inmunitarias xenogénicas.

De esta manera, pueden contemplarse dos enfoques para el modelado *in vivo* de la actividad de las UCART22: modelos animales singénicos y modelos de xenoinjerto tumoral humano en animales inmunodeficientes.

El enfoque de modelo animal singénico implicaría la recreación/redesarrollo de una versión específica de especie de UCART22 para un organismo modelo, seguido de la evaluación de las propiedades funcionales de este producto sustitutivo de UCART22 específico de especie al injertarlo en un huésped singénico. Este enfoque no se considera relevante debido al hecho de que las propiedades de los CAR individuales varían considerablemente, y debido a que diferencias específicas de especie en la función inmunitaria, fisiología y genética comprometen la extrapolación de la actividad de UCART22 en seres humanos.

Se seleccionó el modelo de xenoinjerto murino inmunodeficiente porque permite la injertación de tanto UCART22 como células tumorales humanas CD22<sup>+</sup> (líneas celulares de LLB-A o muestras primarias). Este modelo animal ha sido extensivamente utilizado para la evaluación de la actividad *in vivo* de las terapias de células T CAR. Aunque dichos modelos presentan las mismas limitaciones que los modelos inmunocompetentes anteriormente indicados con respecto a la citotoxicidad en la diana/fuera del tumor y la citotoxicidad fuera de la diana, y eliminan completamente cualquier papel de la no correspondencia del CHM, han demostrado ser extremadamente útiles para evaluar la eficacia antitumoral *in vivo* de las células T CAR. Se han convertido en el estándar *de facto* para la evaluación de la actividad *in vivo* de los productos de células T CAR (ver, por ejemplo, en Carpenito et al., 2009; Gade et al., 2005; Gill et al., 2014; Hudecek et al., 2010; Kenderian et al., 2015; Mardiros et al., 2013; Zhou et al., 2013, entre muchos artículos publicados). Han demostrado ser capaces de discriminar entre la actividad antitumoral relativa de diferentes CAR, subrayando su capacidad de capturar y leer semicuantitativamente las funciones útiles *in vivo* de las células T humanas (ver, por ejemplo, Milone et al., 2009). De esta manera, se han injertado células tumorales CD22<sup>+</sup> humanas en ratones inmunodeficientes (ratones NSG), seguido de la administración de UCART22, con la evaluación en serie de la carga tumoral y el tiempo de supervivencia como un índice de la actividad antitumoral.

#### *Modelos tumorales seleccionados*

Con respecto a los xenoinjertos tumorales, se ha evaluado la actividad *in vivo* de UCART22 contra células Daudi, que es una línea celular de LLA-B CD22<sup>+</sup> (CCL-213, ATCC). La línea celular ha sido modificada para expresar la luciferasa de luciérnaga (y GFP) mediante transducción con un vector lentivírico (amsbio LVP438-PBS) con el fin de seguir la carga tumoral mediante imágenes *in vivo* (células Daudi-Luc-GFP).

#### *Cepas de ratón seleccionadas*

Las cepas de ratón utilizadas en los estudios no clínicos *in vivo* fueron:

- 1/ Ratones NSG altamente inmunodeficientes (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ; The Jackson Laboratory, cepa n.º 5557) que carecía de células T maduras, células B y células NK funcionales, para demostrar la actividad antitumoral.
- 2/ Un modelo de ratón inmunocompetente (ratones C57BL/6 x Balb/c (F1)) para demostrar la eficacia del agotamiento de RQR8 o el mecanismo de CAR CD22 R2.

#### *Métodos de análisis*

Se evaluó la actividad de UCART22 *in vivo* utilizando:

- mediciones de bioluminiscencia de los ratones tratados con respecto al grupo de control (para el modelo de xenoinjerto con líneas celulares expresantes de la luciferasa),
- signos clínicos,
- supervivencia global de los ratones.

#### *Vía de administración*

La vía de administración de UCART22 en animales es la inyección intravenosa (dosis no dividida única). En el ser humano, también se inyectaron por vía intravenosa UCART19 y UCART22 (dosis no dividida), una, dos, tres o cuatro veces, solos o uno después del otro de acuerdo con la secuencia siguientes: 19 22 19 22 19 o 22 19 22 19 o 19/22 19/22.

#### *Demostración de la actividad antitumoral in vivo de UCART22*

Se demostró la actividad de UCART22 en ratones inmunodeficientes injertados con células tumorales humanas Daudi-Luc-GFP con varios lotes de desarrollo de UCART22. En la figura 8 se muestra un ejemplo de un estudio. Además, se está realizando un estudio de confirmación para evaluar la actividad *in vivo* de un lote BFP de UCART22. Brevemente, ratones NSG recibieron la inyección intravenosa de  $0,5 \times 10^6$  células Daudi-Luc-GFP el día 7 y fueron tratadas el día 0 con UCART22 (inyección intravenosa, 2 dosis:  $3 \times 10^6$  y  $10 \times 10^6$  células UCART22/ratón, 5



ratones/grupo) o se dejaron sin tratar (inyección de vehículo). Como control se inyectaron células T no transducidas doble KO para TRAC y CD52 (DKO NTD). Las dosis de UCART22 administradas se determinaron de acuerdo con las dosis de células T CAR<sup>+</sup> utilizadas en la literatura para demostrar actividad antitumoral *in vivo* de otras células T CAR CD22 (Haso et al., 2013). El tratamiento de UCART22 resultó en la eliminación de las células tumorales, tal como mostraban las imágenes *in vivo*, y una supervivencia ampliada, con todos los ratones tratados vivos al final del estudio (80 días después del tratamiento de UCART22). Dichos resultados demostraron la actividad antitumoral de UCART22.

*Las células CD52<sup>+</sup> son resistentes al alemtuzumab in vivo y las células T CAR<sup>+</sup>CD52<sup>+</sup> muestran actividad in vivo en presencia de alemtuzumab*

Los estudios realizados durante el desarrollo de UCART19, otro producto de UCART que contiene la misma doble inactivación TRAC/CD52, demostró que las células T CD52 son resistentes al alemtuzumab *in vivo* (Poirot et al., 2015).

Además, la actividad de las células UCART19 en presencia de alemtuzumab fue demostrada en un modelo de xenoinjerto tumoral en ratones NSG. Todos los ratones que recibieron células tumorales pero ninguna célula UCART19 mostraron progresión tumoral que condujo al sacrificio 13 días después de la inyección. En 5 de 7 ratones que recibieron tumor y células UCART19, el tumor fue completamente controlado alcanzado el día 13 y en los dos ratones restantes, se observaron respuestas parciales. En contraste, se observó que el tratamiento de alemtuzumab solo retrasaba la progresión del tumor sin infusión de células UCART19 (6/6 ratones). En los ratones tratados con alemtuzumab en combinación con células UCART19, se eliminaron las células tumorales de la médula ósea, según evaluación mediante luminometría o citometría de flujo de suspensiones celulares obtenidas de médula ósea aislada 13 días después de la inyección.

En conclusión, los ratones que recibieron terapia de alemtuzumab 2 días antes de la infusión de células UCART19 demostraron eficacia antitumoral de las células UCART19 en la presencia de alemtuzumab *in vivo*. Además, los datos de injertación de bazo el día 13 mostraron que las células T CD52<sup>+</sup> eran resistentes al alemtuzumab *in vivo*.

*Demostración de la depleción eficaz inducida por rituximab de las células RQR8<sup>+</sup> in vivo*

La susceptibilidad de las UCART22 RQR8<sup>+</sup> a la depleción por RTX ha sido mostrada previamente *in vitro*. Además, el grupo de Martin Pule ha mostrado que el RTX fue capaz de eliminar las células RQR8<sup>+</sup> en un modelo de ratón inmunocompetente utilizando un RTX remodificado en un ratón IgG2a, el equivalente funcional de la IgG1 humana (mRtx-IgG2a) (Philip et al., 2014). Dicho anticuerpo ha sido adaptado para la utilización en sistemas murinos mediante transferencia de las partes ligantes de RTX a un Fc murino, permitiendo la unión a receptores Fc murinos con una afinidad aproximadamente igual a la del RTX cuando se une a receptores Fc humanos. El estudio se llevó a cabo utilizando un modelo de transferencia adoptiva haploidéntica inmunocompetentes con esplenocitos de C57BL/6 transducidos con RQR8, transferidos a receptores de cruce (F1) de C57BL/6 x Balb/c irradiados no letalmente. Este modelo permite buenos niveles de injertación en todo el tejido linfóide sostenido por estimulación alogénica, aunque también conserva los linfocitos endógenos.

El día 1, se inyectaron por vía intravenosa 1,5x10<sup>6</sup> esplenocitos de donante RQR8<sup>+</sup> de ratones C57BL/6 (esplenocitos transducidos utilizando un retrovirus codificante de un constructo RQR8-2A-GD2CAR y purificados utilizando perlas CD34 de Miltenyi), en ratones F1 (C57BL/6 x Balb/c), 4 horas después de un preacondicionamiento de irradiación de rayos X de 5 Gy. El día 7, se confirmó la injertación de las células donantes mediante citometría de flujo de la sangre periférica. Los ratones fueron tratados tres veces con RTX murinizado (ritux-mIgG2a 150 µg, inyectado por vía intravenosa en la vena de la cola el día 7, día 10 y día 12) o PBS (sin tratamiento). Cada cohorte presentaba 5 ratones. Los animales fueron sacrificados el día 14 para el análisis de citometría de flujo de bazo, médula ósea, sangre y ganglios linfáticos. En los ratones tratados con RTX, se observó una depleción de 50 %, 60 % y 70 % de las células RQR8<sup>+</sup> en bazo, médula ósea y sangre, respectivamente, dentro de las 6 horas posteriores a la terapia de ritux-mIgG2a de los ratones.

También se llevó a cabo el mismo estudio con el CAR anti-CD19 utilizado en el producto UCART19. UCART19 también es un producto de células T CAR modificadas alogénicas que contienen el mismo constructo de RQR8 que las UCART22.

*Readministración*

El presente estudio evaluó la actividad antitumoral de inyecciones únicas o múltiples de UCART22. Línea celular de tumor de LLA-B expresante de CD22 (Daudi con nivel alto de expresión de CD22). Las células se transdujeron con un vector lentivírico con el fin de expresar GFP y luciferasa de luciérnaga.

Se inyectaron por vía intravenosa células tumorales (0,5x10<sup>6</sup> Daudi-Luc-GFP) el día 7 en ratones NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, cepa 005557, The Jackson Laboratory) a través de la vena de la cola. El día 0, los ratones fueron aleatorizados según la señal de bioluminiscencia medida el día -1 y el peso corporal en 11 grupos de 6 ratones.

Se administró 1, 2 o 3 tratamientos de UCART22 (1 o 3 millones de células CAR<sup>+</sup>/ratón cada uno). Se inyectaron por vía intravenosa UCART22 en los ratones los días 0 +/- día 10 +/- día 20.

Se evaluó la actividad antitumoral de UCART22 a partir de la carga tumoral, seguido de imágenes de bioluminiscencia los días -1, 7, 14, 21, 28 y 35, mediante observación de los signos clínicos y la supervivencia de los ratones.

#### *Modelo Daudi, tratamiento de $1 \times 10^6$ células UCART22/ratón*

Los ratones tratados 2 o 3 veces con  $1 \times 10^6$  UCART22 mostraron un mejor control de la progresión tumoral y una supervivencia más larga en comparación con los ratones tratados una vez con  $1 \times 10^6$  UCART22 (supervivencia de 80 % el día 60 con 3 dosis, comparado con 0 % con una dosis).

En un experimento, se inyectaron por vía intravenosa UCART19 en los ratones el día 30. En estos ratones todavía vivos el nivel de células de cáncer era inferior a la detección el día 90.

#### *Sumarios*

Se demostró la actividad de UCART22 *in vitro* e *in vitro* contra las líneas celulares de LLA-B y *in vitro* contra muestras de LLA-B primario.

Las UCART22 son células T alogénicas y, de esta manera, deberían eliminarse tras la recuperación del sistema inmunitario del paciente. Además, las UCART2 se modifican para coexpresar RQR8, una proteína membranar corta que proporciona dos epítomos que se unen al anticuerpo monoclonal rituximab. Por lo tanto, RQR8 proporciona un medio para reducir el número de UCART22 RQR8<sup>+</sup> mediante administración de rituximab en el caso de una toxicidad relacionada con UCART22 no gestionable, tal como el síndrome de liberación de citoquinas (SLC) o la EICH o previamente al trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (alo-HSCT, por sus siglas en inglés). La eficacia del rituximab para eliminar las células RQR8<sup>+</sup> *in vitro* se ha demostrado utilizando ensayos CDC y ADCC. Además, se ha demostrado la eficiencia de la depleción inducida por rituximab de células RQR8<sup>+</sup> *in vivo* en sangre, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos utilizando un modelo de ratón inmunocompetente y una versión murinizada del rituximab.

Se obtuvieron resultados similares utilizando un CAR anti-CD22 R2 o QR3 expresado en células T deficientes en CHM CI y deficientes en TCR.

Se ha demostrado resistencia al alemtuzumab de las células CD52<sup>+</sup> *in vitro* e *in vivo*, permitiendo el uso potencial del alemtuzumab en el régimen de linfodepleción.

Por último, se ha observado resistencia a la destrucción mediada por células T CD8<sup>+</sup> utilizando CAR anti-CD22 R2 expresado en células T deficientes en TCR y deficientes en CHM CI.

Los estudios adicionales realizados para evaluar diversos riesgos se resumen en las Tablas I y J y se detallan en los apartados posteriormente.

Tabla I. Lista de estudios de toxicología *in vitro* realizados.

Estudio	Elemento de ensayo	Método	Estudio BPL/BPF	Resultados
Persistencia de TALEN®	Células T transfectadas con ARNm codificante de TALEN® TRAC, CD52 y B2M (ARNm de grado BPF).	Transferencia western	No	Algunos experimentos que han examinado la persistencia de las proteínas TALEN® dentro de las células T humanas primarias han mostrado niveles elevados de proteínas TALEN® se detectan únicamente en las primeras 24 h después de la electroporación

(continuación)

Estudio	Elemento de ensayo	Método	Estudio BPL/BPF	Resultados
Corte fuera de diana inducido por TALEN®	Las células T transfectadas con TALEN® B2M, TRAC CD52 solo o combinado.	Secuenciación Guide	No	Se llevó a cabo secuenciación GUIDE para identificar los sitios fuera de diana potenciales por un análisis de todo el genoma no sesgado
	UCART22	Secuenciación de alto rendimiento	No	La secuenciación de alto rendimiento de células T humanas tratadas con TALEN® TRAC y CD52 confirmó una frecuencia extremadamente baja ( $2,1-3,9 \times 10^{-3}$ ) de modificaciones en tres de los sitios fuera de diana putativos identificados mediante el método GUIDE-seq.
	UCART22		GMP	El nivel de modificaciones en los tres sitios fuera de diana confirmados se evaluó en todos los lotes BPF
Estabilidad genética	UCART22	Análisis de cariotipo/FISH	No	Se llevó a cabo el cariotipado y análisis FISH en lotes de desarrollo de UCART22 para evaluar la frecuencia de traslocaciones
	UCART22		GMP	Se llevó a cabo cariotipado en BPF en todos los lotes BPF como criterio de liberación. Se llevó a cabo el análisis de FISH en caso de detectarse traslocaciones mediante cariotipado
	UCART22	Ensayo de proliferación independiente de IL-2	No	No se observó proliferación independiente de IL-2 tras 18 días de cultivo en los lotes de desarrollo de UCART22 evaluados
	UCART22		GMP	El ensayo de liberación de proliferación independiente de IL2 destinado a detectar cualquier ventaja clonal inducido por modificaciones génicas se llevó a cabo en todos los lotes BPF como criterio de liberación
	UCART22	PCRq	GMP	Se medirá el número de copias de vector en todos los lotes BPF
Ensayo de reactividad cruzada de tejidos	Péptido de fusión scFv-CD22(m971)-CD8-mFc: m971scFv-CD8 bisagra-fragmento Fc de IgG1 de ratón	Análisis inmunohistoquímico contra un panel de tejidos humanos	BPL	En el panel de tejidos humanos, se observó la unión de scFv-CD22(971)-CD8-mFc en la membrana plasmática, en compartimientos de folículo linfóide de órganos linfoides y dentro de agregados/infiltrados mucosos linfoides de varios otros tejidos. Basándose en la morfología y la distribución, las células diana eran generalmente consistentes con linfocitos B. No se produjo ninguna unión fuera de diana inesperada significativa de scFv-CD22(971)-CD8-mFc en tejidos humanos
Retrogenix		Tecnología de micromatrices celulares	No	La especificidad de unión de la proteína de fusión scFv-CD22(m971)-CD8-mFc está bajo evaluación utilizando la plataforma Retrogenix

Tabla J. Lista de estudios de toxicología *in vivo*.

Estudio	Elemento de ensayo	Modelo animal	Estudio de GLP	Resultados
EICH potencial	UCART22 y productos UCART anteriores (UCART19 y UCART123) o células T no modificadas (NTD, por sus siglas en inglés) en control	Ratones NSG irradiados a 2 Gy 1 día antes de la inyección de células T	Tipo BPL	En todos los ratones en que se inyectaron células T no modificadas positivas para TCRαβ mostraron cambios relacionados con el tratamiento considerados probablemente sugestivos de EICH (pérdida de peso y cambios histopatológicos) con relación con la dosis de la gravedad y el momento de aparición. Sin embargo, los productos UCART no indujeron ningún signo de EICH en el modelo seleccionado y durante el periodo de seguimiento hasta los 80 días.

El riesgo potencial de EICH se evaluó en ratones inmunodeficientes durante el desarrollo de los productos UCART anteriores. Este modelo animal permite la injertación eficiente de células T humanas y se ha mostrado previamente que desarrolla consistentemente EICH xenogénica tras la inyección de PBMC o células T humanas (Ali et al., 2012; Schroeder y DiPersio, 2011).

#### *Actividad fuera de diana del CAR CD22*

La especificidad de CD22 del CAR CD22 se evaluó mediante un estudio de reactividad cruzada de tejidos conforme a BPL que no mostró unión fuera de diana inesperada significativa del componente scFv del CAR CD22 con tejidos humanos y se está realizando un cribado con Retrogenix. Además, los datos clínicos publicados sobre un paciente tratado con células T CAR derivadas de m971 no mostraron toxicidad fuera de diana (Fry et al., 2017).

Debido a que CD22 se expresa sobre células B normales, se prevé un riesgo de aplasia de células B, resultante de la actividad en la diana/fuera del tumor de UCART22, con la condición de que persistan las UCART22.

#### *EICH de las UCART22 CAR*

Una característica de seguridad esencial del producto UCART22 es si el potencial de UCART22 de mediar en una reacción de EICH ha sido anulado por la disrupción del gen TRAC y la purificación de células TCRαβ. Se evaluó dicho riesgo durante el desarrollo de los productos UCART anteriores (UCART19 y UCART123) en estudios preclínicos *in vivo*. Se observaron signos de EICH en todos los ratones NSG inyectados con células T no modificadas con resultados más graves a la dosis más alta, pero no se observaron cambios relacionados con el tratamiento en los ratones inyectados con UCART. En la clínica, hasta el momento, entre los catorce pacientes tratados con UCART19, cuatro de ellos desarrollaron una EICH cutánea que era leve a moderada (3 de grado 1 y 1 de grado 2 (Qasim et al., 2017) y datos presentados en la reunión de la ASH de 2017 por R. Benjamin y W. Qasim) y controlable sin tratamiento sistémico.

#### *CRS*

Se han identificado otros riesgos de seguridad potenciales asociados a la administración de productos inmunoterapéuticos y con enfermedad tratada subyacente: reacción relacionada con la infusión, síndrome de liberación de citoquinas (SLC), síndrome de lisis tumoral, infecciones y neurotoxicidad. El SLC es un acontecimiento adverso frecuente en la inmunoterapia y especialmente en ensayos de células T CAR. En ensayos clínicos con células T CAR anti-CD19 autólogas, la intensidad de la liberación de citoquinas observada era el resultado de una combinación de varios parámetros, tales como la dosis de células T CAR inyectada, los dominios de señalización de los CAR (4-1BB/CD28), el nivel de proliferación de las células T CAR y la carga tumoral del paciente en el día de administración. Estos riesgos se evaluaron *in vivo* en un modelo similar al publicado recientemente (Taraseviciute, A., Kean, L. y Jensen, M. C. (2016). Creation of the First Non-Human Primate Model That Faithfully Recapitulates Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell-Mediated Cytokine Release Syndrome (CRS) and Neurologic Toxicity Following B Cell-Directed CAR-T Cell Therapy. *Blood*, 128(22), 651. Acceso el 28 de marzo de 2018. Recuperado de <http://www.bloodjournal.org/content/128/22/651>).

#### *Recomendación de dosis inicial para los estudios de FIH*

Los métodos estándares para la determinación de la dosis clínica no son transponibles a la inmunoterapia basada en células T CAR debido a la relevancia limitada del modelo o modelos animales, la naturaleza biodinámica del producto y el mecanismo inmunitario adoptivo de acción.

Por lo tanto, la elección de la dosis clínica inicial se basa principalmente en (i) la experiencia previa obtenida con células T CAR administradas en seres humanos (literatura sobre células T CAR autólogas), (ii) los casos humanitarios

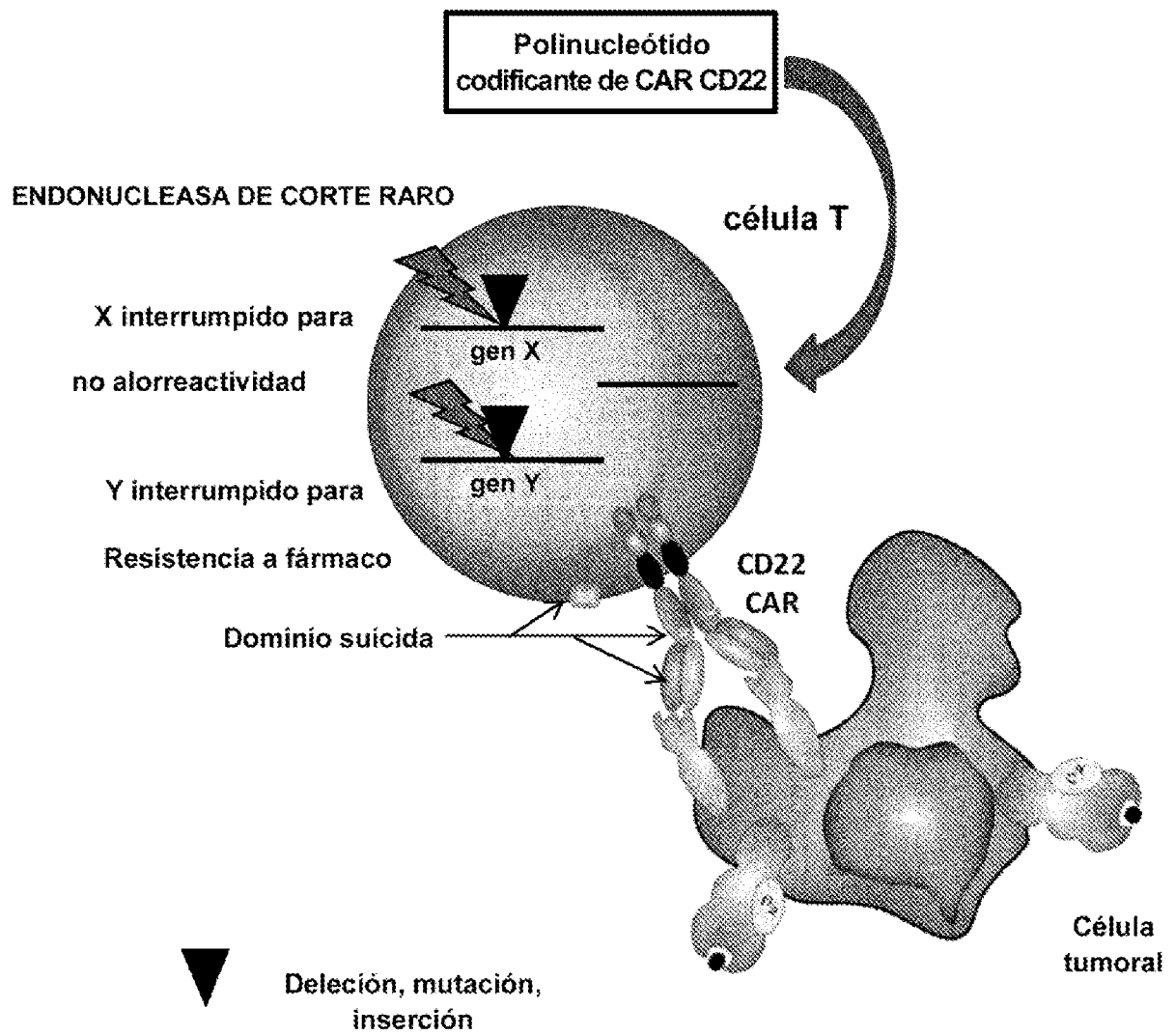
y los pacientes tratados en los estudios clínicos en curso con UCART19 en la University College London (UCL) y la King's College London (KCL) (referencia a Qasim et al., 2017) y las presentaciones por R. Benjamin y W. Qasim en la reunión de la ASH de 2017) y (iii) las dosis actualmente en investigación o aprobadas en otros estudios de CAR autóloga de LLA-B. El enfoque se describe en el apartado clínico.

Los primeros resultados de estudios clínicos muestran una reducción de la masa tumoral en ambos ensayos (>80 %) en pacientes tratados con UCART22. Además, los datos demuestran que incluso después de un tratamiento corto aunque eficiente (de dos dosis) puede interrumpirse y eliminar células B malignas (73 % de remisión en 150 días), especialmente después de la readministración y/o utilización de UCART22 y UCART19.

## REIVINDICACIONES

1. Célula T modificada con inactivación de receptor de células T humanas (KO TCR) dotada de un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico para CD22 (UCART22), un interruptor de seguridad, preferentemente expresado en la superficie celular, comprendiendo dicho CAR anti-CD22 (CAR CD22):
  - i) por lo menos un dominio extracelular que comprende:
    - un dominio bisagra de CD8alfa,
    - un dominio de unión a antígeno específico para CD22, opcionalmente una secuencia líder,
  - ii) un dominio transmembranal de CD8alfa, y
  - iii) un dominio de señalización intracelular, presentando dicho CAR CD22 una secuencia polipeptídica con una identidad de por lo menos 80 % respecto a la secuencia SEC ID n.º 15, comprendiendo dicho interruptor de seguridad:
    - un RQR8 temporalmente unido al CAR CD22 por el péptido 2A, o
    - por lo menos dos epítomos específicos del mAb rituximab, preferentemente situados entre el VH y el dominio bisagra, o 3 epítomos específicos del mAb rituximab o 3 epítomos específicos del mAb rituximab y un epítomo específico de mAb QBEN-10 unido al CAR CD22.
2. UCART22 según la reivindicación 1, en el que se inserta una secuencia polinucleótida que presenta una identidad de por lo menos 80 % respecto a SEC ID n.º 11 en el genoma, y que comprende además un gen TRAC inactivado con una inserción, una delección o una mutación dentro de la SEC ID n.º 18, con un nivel indetectable de receptor de células T (TCR) en la superficie celular medido mediante citometría de flujo, y un nivel indetectable de acontecimientos fuera de diana medido mediante una técnica de secuenciación Guide.
3. UCART22 según la reivindicación 2, en el que dicha secuencia polinucleótida se inserta en el gen TRAC.
4. UCART según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende otro gen inactivado seleccionado de entre gen dCK, el gen B2M, el gen CD52, preferentemente el gen CD52.
5. UCART22 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que está inactivado por lo menos un gen adicional, en donde dicho gen se selecciona de un gen codificante de receptor de hidrocarburo arilo (AHR), receptor de factor beta de crecimiento transformante (receptor de TGF-beta), receptor de interleuquina-10 (IL-10R), proteína 1 de muerte celular programada, o una combinación de los mismos.
6. UCART22 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende un scfv adicional específico para cualquiera de los antígenos de superficie asociados a tumor siguientes, seleccionados de entre CD19, CD20, CD30, una molécula de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), una inmunoglobulina (Ig), CD3, CD5, CD34, CD79, preferentemente CD79b, CD138, B7-1 (CD80), BCMA (CD269, TNFRSF 17), FLT-3, o PAX5, preferentemente CD19.
7. UCART22 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho CAR CD22 comprende, además, un dominio de unión a antígeno específico para CD19 o en el que dicho UCART22 comprende, además, un CAR CD19, preferentemente un CAR CD19 que presenta una identidad de por lo menos 80 % respecto a la SEC ID n.º 25 o a la SEC ID n.º 26.
8. Población de células UCART que comprende UCART22 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Población de células UCART según la reivindicación 8, que comprende un UCART19, preferentemente un UCART19 que expresa un CAR anti-CD19 que comprende la secuencia SEC ID n.º 25 o la secuencia SEC ID n.º 26 en la superficie celular.
10. Kit que comprende un UCART22 y un UCART19 para una administración sucesiva (por lo menos una) o una concomitante, o una sucesiva (por lo menos una) y después la administración concomitante en un paciente que lo necesita.
11. Kit según la reivindicación 10 que comprende, además, un tratamiento de linfodepleción, administrado antes de UCART.
12. Composición farmacéutica que comprende el UCART22 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una población de células que comprende dicho UCART22 según la reivindicación 8 o 9 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

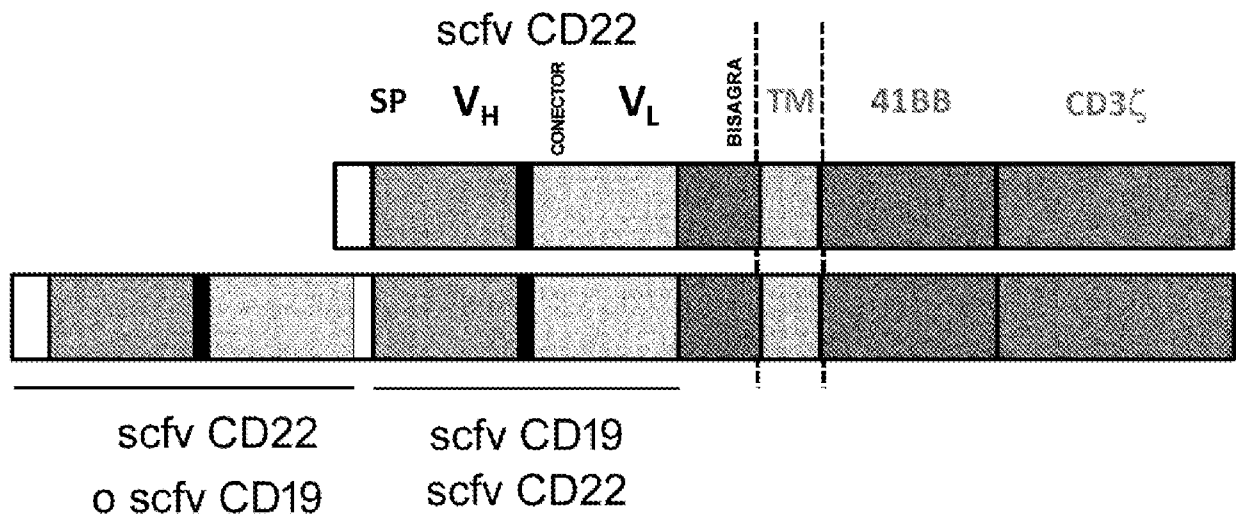
13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12 que comprende, además, una briostatina, preferentemente la briostatina-1.
- 5 14. Composición farmacéutica según la reivindicación 12 o 13 o el kit según la reivindicación 10 o 11 para su utilización con un medicamento para la prevención o el tratamiento de un paciente que sufre de un cáncer mediado por CD22<sup>+</sup> o una enfermedad inflamatoria mediada por CD22<sup>+</sup> y/o para la prevención o el tratamiento de un paciente que sufre de un cáncer mediado por CD19<sup>+</sup> o una enfermedad inflamatoria mediada por CD19<sup>+</sup>.
- 10 15. Composición farmacéutica según la reivindicación 12 o 13 o el kit según la reivindicación 10 o 11 para su utilización según la reivindicación 14 para el tratamiento de un cáncer hemático mediado por CD22 y/o un cáncer hemático mediado por CD19, seleccionado de entre linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, leucemia, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica tipo B, leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de Burkitt, cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, un cáncer hemático expresante de CD22 refractario recidivante, una forma agresiva de dicho cáncer hemático relacionado con CD22, un cáncer hemático expresante de CD19 refractario recidivante y una forma agresiva de dicho cáncer hemático relacionado con CD19.
- 15 16. Composición farmacéutica según la reivindicación 12 o 13, o el kit según la reivindicación 10 o 11 para su utilización según la reivindicación 14 para el tratamiento de un LLA-B expresante recidivante o refractaria, preferentemente como una indicación pediátrica.
- 20 17. Composición farmacéutica según la reivindicación 12 o 13, o el kit según la reivindicación 10 o 11 para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en la que el tratamiento de un paciente comprende la administración de por lo menos un anticuerpo monoclonal (mAb), preferentemente QBEN10 y/o rituximab, en un paciente, a una dosis que permite la puesta en contacto de dichas UCART22 con dicho o dichos mAb específicos.
- 25



**Figura 1**



CAR anti-CD22 y/o CD19 de cadena sencilla



CAR anti-CD22 o -22/19 multicadena

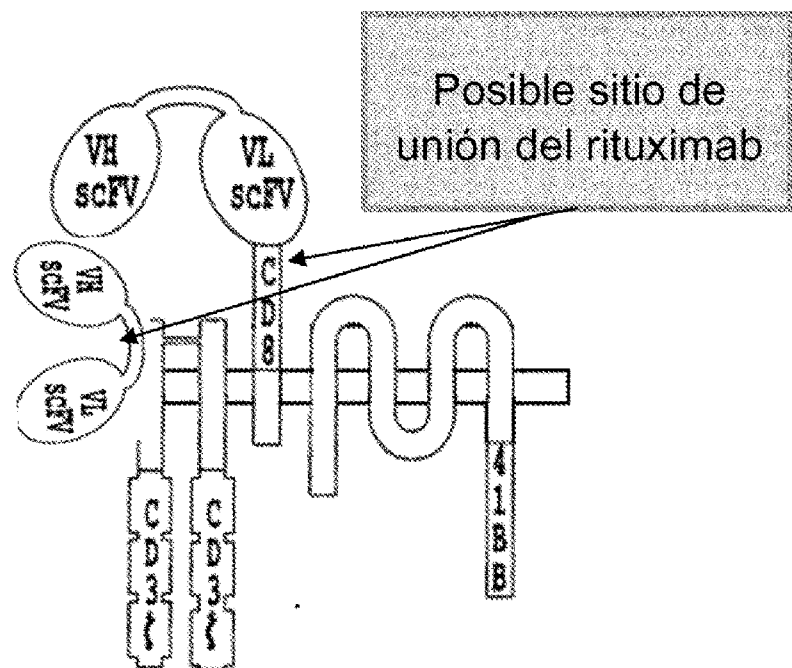
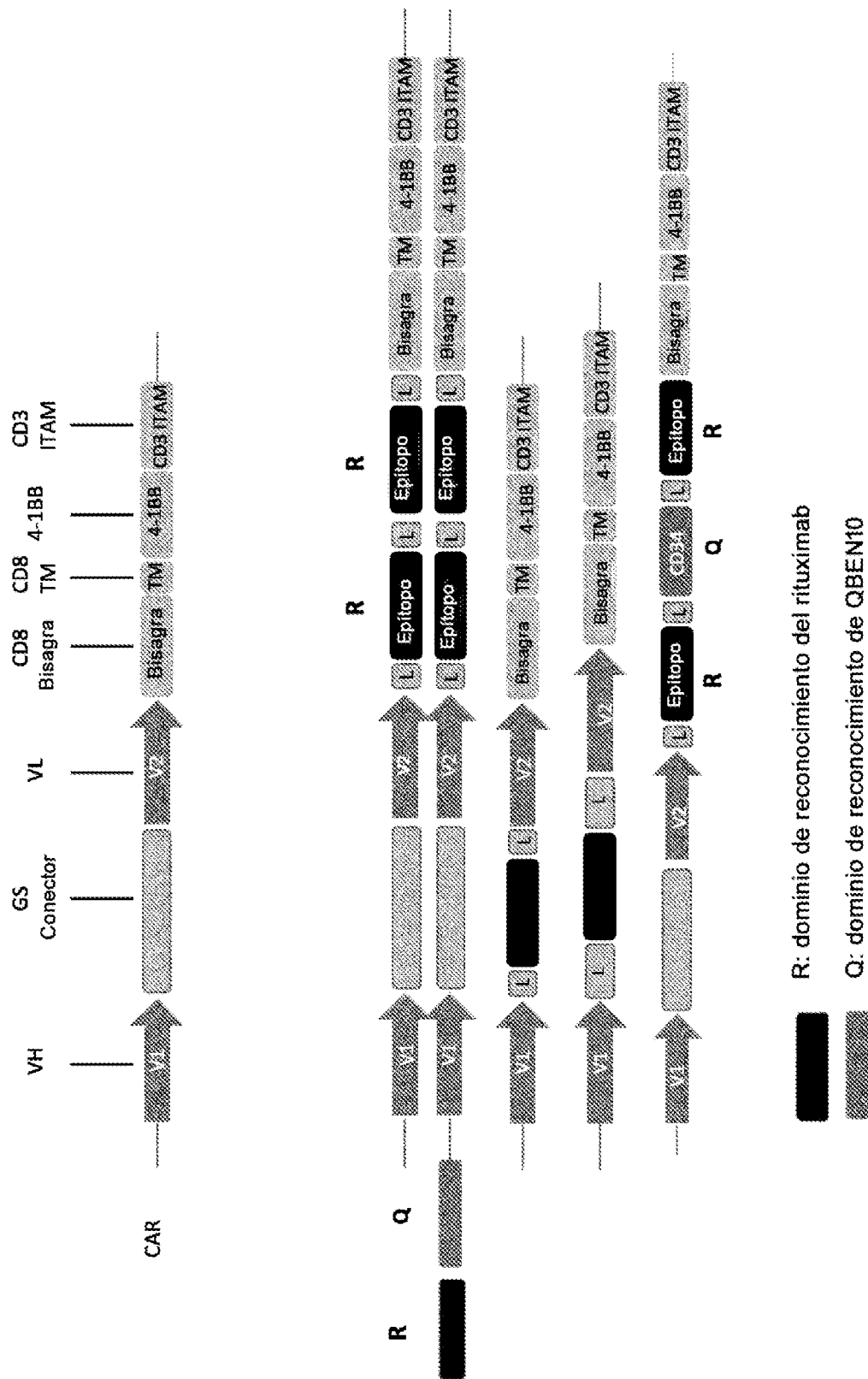
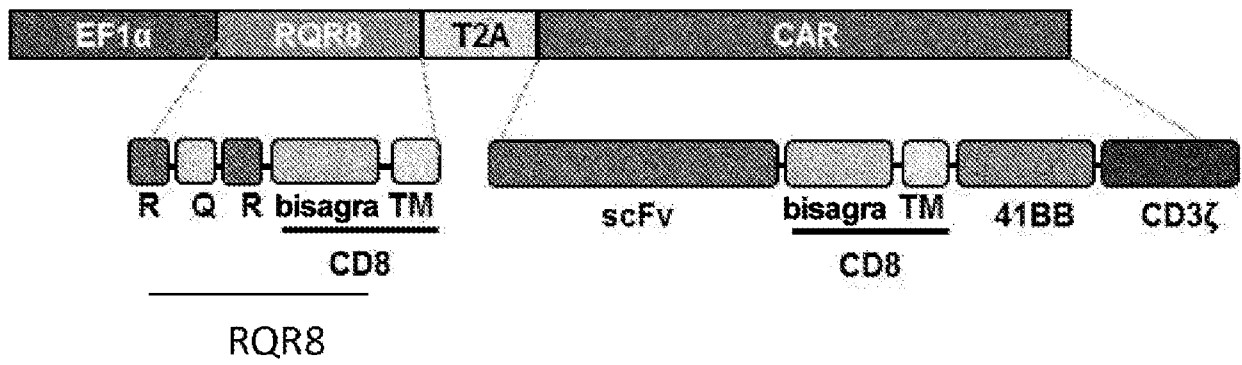
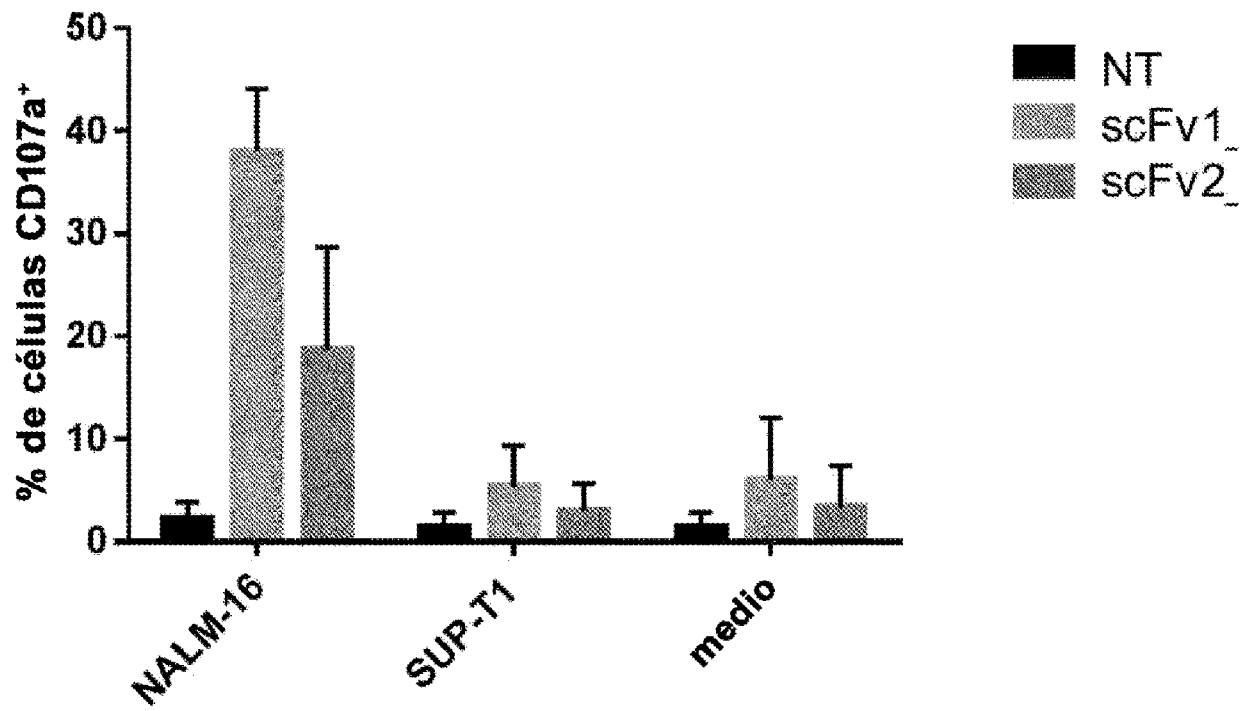


Figura 2

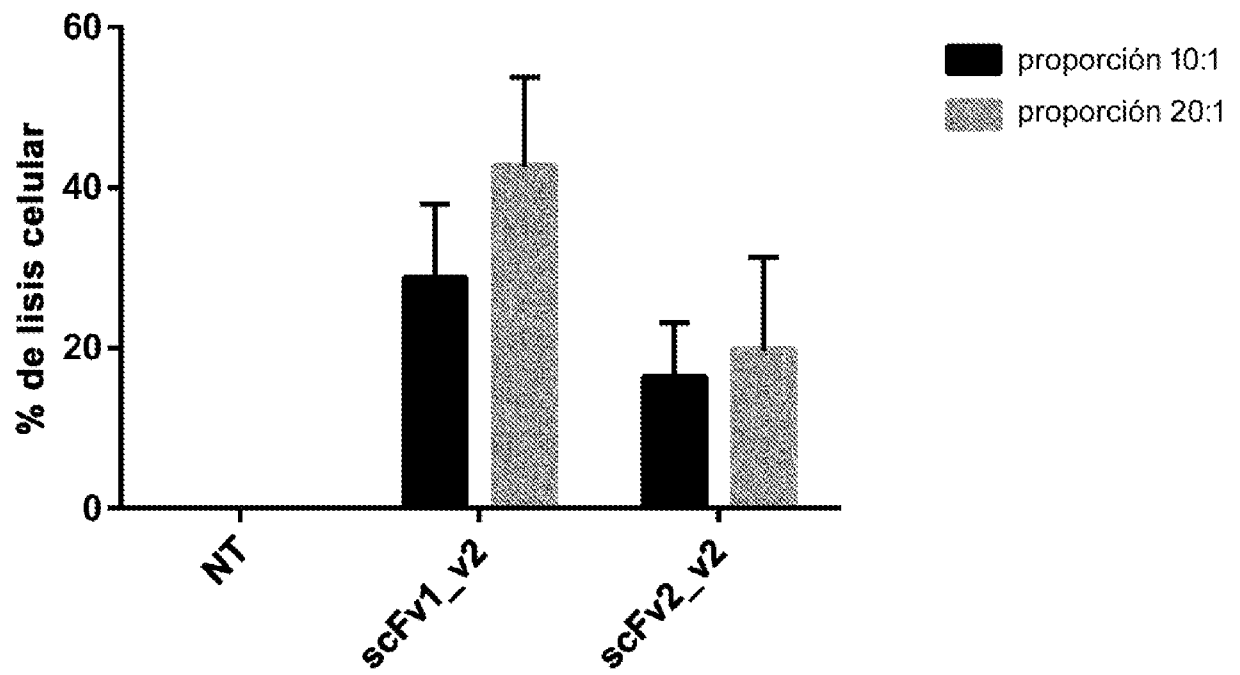




**Figura 4**



**Figura 5**



**Figura 6**

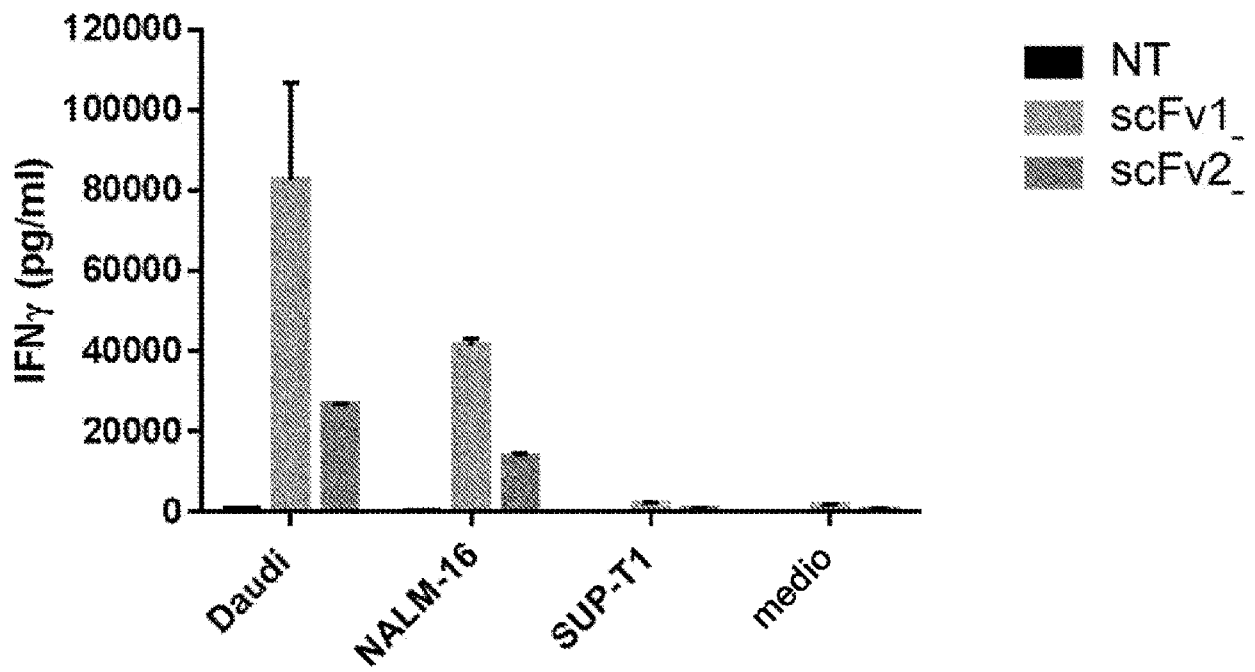
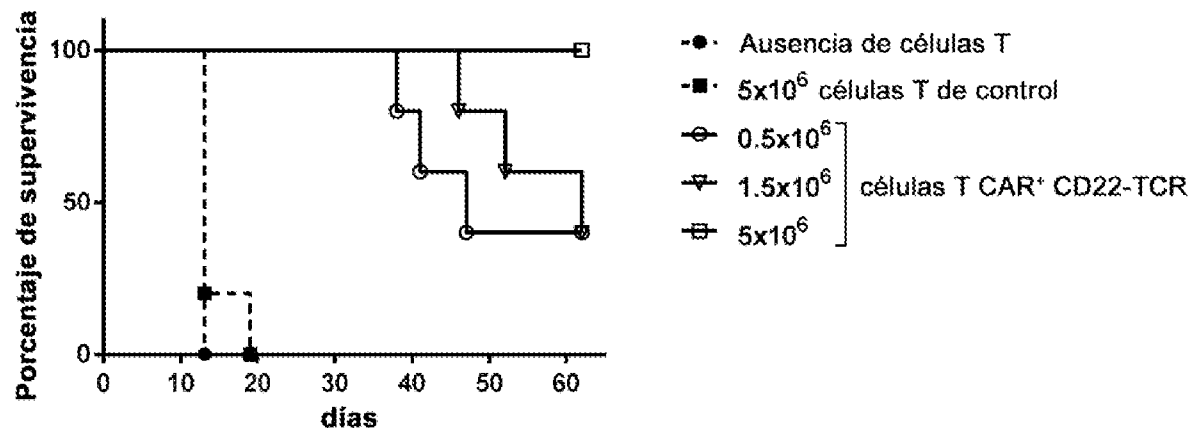
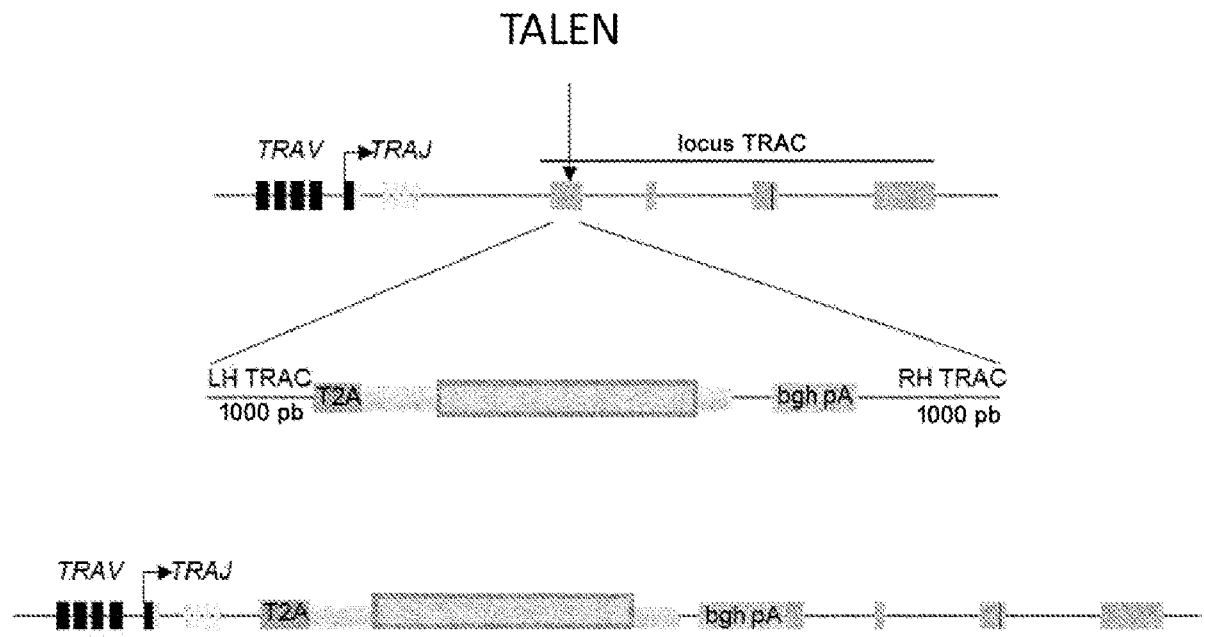


Figura 7



**Figura 8**



Gen que va a insertarse 

**Figura 9**