(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 854 731**

(51) Int. CI.:

A61K 35/17 (2015.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2016 PCT/US2016/037120**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016 WO16201394**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2016 E 16808492 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2020 EP 3307877**

(54) Título: **Procedimiento para tratar cáncer con células T modificadas genéticamente**

(30) Prioridad:

12.06.2015 US 201562175003 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.09.2021

(73) Titular/es:

LENTIGEN TECHNOLOGY, INC. (100.0%)
910 Clopper Road, Suite 200S
Gaithersburg, MD 20878, US

(72) Inventor/es:

DROPULIC, BORO;
ORENTAS, RIMAS;
SCHNEIDER, DINA y
KRUEGER, WINFRIED

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

Procedimiento para tratar cáncer con células T modificadas genéticamente

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reclama el beneficio de prioridad según 35 U.S.C. Sección 119(e) a la solicitud de patente provisional de Estados Unidos Nº 62/175.003, presentada el 12 de junio de 2015.

Campo de la divulgación

La presente solicitud se refiere al campo del cáncer, en particular a una composición que comprende células presentadoras de antígenos autólogas transducidas con vectores lentivirales que expresan transcritos de cáncer mutados específicos del paciente cocultivadas con células T autólogas transducidas con receptores antigénicos quiméricos (CAR) y a procedimientos de uso en inmunoterapia combinada específica de paciente.

Antecedentes de la invención

El cáncer es una de las amenazas más letales para la salud humana. Solo en Estados Unidos, el cáncer afecta a casi 1,3 millones de pacientes nuevos al año y es la segunda causa principal de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares, lo que representa aproximadamente 1 de cada 4 muertes. Los tumores sólidos son responsables de la mayor parte de esas muertes. Aunque se han producido avances significativos en el tratamiento médico de determinados tipos de cáncer, la tasa de supervivencia general a 5 años para todos los tipos de cáncer ha mejorado solo en aproximadamente el 10% en los últimos 20 años. Los cánceres, o tumores malignos, se metastatizan y crecen rápidamente de forma descontrolada, lo que dificulta enormemente el tratamiento. Una de las dificultades de los tratamientos modernos contra el cáncer es la cantidad de tiempo que transcurre entre la biopsia y el diagnóstico del cáncer y el tratamiento eficaz del paciente. Durante este tiempo, el tumor de un paciente puede crecer sin impedimentos, haciendo que la enfermedad progrese más antes de que se aplique el tratamiento. Esto afecta negativamente el pronóstico y a la evolución del cáncer.

Los receptores antigénicos quiméricos (CAR) son moléculas híbridas que comprenden tres unidades esenciales: (1) un motivo de unión a antígeno extracelular, (2) motivos de enlace/transmembrana y (3) motivos de señalización de células T intracelulares (Long AH, Haso WM, Orentas RJ. Lessons learned from a highly-active CD22-specific chimeric antigen receptor. Oncoimmunology. 2013; 2 (4): e23621). El motivo de unión a antígeno de un CAR está diseñado normalmente como un fragmento variable monocatenario (scFv), el dominio de unión mínimo de una molécula de inmunoglobulina (Ig). También se han modificado genéticamente motivos de unión a antígeno alternativos, tales como ligandos de receptor (es decir, se han modificado genéticamente IL-13 para que se unan al receptor de IL-13 expresado en tumores), inmunorreceptores intactos, péptidos derivados de bibliotecas y moléculas efectoras del sistema inmunológico innato (tales como NKG2D). Se encuentran en desarrollo, también, dianas celulares alternativas para la expresión de CAR (tales como las células T NK o gamma-delta) (Brown CE et al. Clin Cancer Res. 2012; 18 (8): 2199-209; Lehner M et al. PLoS One. 2012; 7 (2): e31210). Aún queda por realizar un trabajo importante con respecto a definir la población de células T más activa para transducir con vectores CAR, determinar las técnicas óptimas de cultivo y expansión y definir los detalles moleculares de la estructura de la proteína CAR en sí.

Los motivos de enlace de un CAR pueden ser un dominio estructural relativamente estable, tal como el dominio constante de IgG, o pueden estar diseñados para que sean un enlazador flexible extendido. Pueden utilizarse motivos estructurales, tales como los derivados de dominios constantes de IgG, para extender el dominio de unión scFv más allá de la superficie de la membrana plasmática de células T. Esto puede ser importante para algunas dianas tumorales en las que el dominio de unión está particularmente cerca de la membrana superficial de la célula tumoral (tal como para el disialoganglíosido GD2; Orentas et al., observaciones no publicadas). Hasta la fecha, los motivos de señalización utilizados en los CAR siempre incluyen la cadena CD3-ζ debido a que este motivo central es la señal clave para la activación de las células T. Los primeros CAR de segunda generación de los que se informó presentaban dominios de señalización de CD28 y la secuencia transmembrana de CD28. Este motivo se utilizó en CAR de tercera generación que contienen motivos de señalización de CD137 (4-1BB) también (Zhao Y et al. J Immunol. 2009; 183 (9): 5563-74). Con el advenimiento de una nueva tecnología, la activación de células T con perlas unidas a anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, y la presencia de la "señal 2" canónica de CD28, ya no era necesario que se codificara por el propio CAR. Utilizando la activación de perlas, se encontró que los vectores de tercera generación no eran superiores a los vectores de segunda generación en ensayos *in vitro*, y no proporcionaban un beneficio claro sobre los vectores de segunda generación en modelos de leucemia en ratones (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. 2013; 121 (7): 1165-74; Kochenderfer JN et al. Blood. 2012; 119 (12): 2709-20). Esto se ve confirmado por el éxito clínico de los CAR específicos de CD19 que se encuentran en un CD28/CD3-ζ de segunda generación (Lee DW et al. American Society of Hematology Annual Meeting. Nueva Orleans, LA; 7-10 de diciembre 2013) y un formato de señalización CD137/CD3-ζ (Porter DL et al. N Engl J Med. 2011; 365 (8): 725-33). Además de CD137, otros miembros de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, tales como OX40, también pueden proporcionar señales de persistencia importantes en las células T transducidas con CAR (Yvon E et al. Clin Cancer Res.

2009; 15 (18): 5852-60). Igualmente importantes son las condiciones de cultivo en las que se cultivaron las poblaciones de células CAR-T.

Los desafíos actuales en la adaptación más generalizada y eficaz de la terapia CAR contra el cáncer se relacionan con la falta de dianas atractivas. La creación de agentes de unión para los antígenos de superficie celular se puede lograr ahora fácilmente, pero descubrir un antígeno de superficie celular que sea específico para el tumor sin que afecte a los tejidos normales sigue siendo un desafío importante. Una forma potencial de imbuir una mayor especificidad respecto a la célula diana a las células T que expresan CAR es utilizar enfoques CAR combinatorios. En un sistema, las unidades de señal CD3-ζ y CD28 se dividen entre dos constructos CAR diferentes expresados en la misma célula; en otro, dos CAR se expresan en la misma célula T, pero uno tiene una afinidad menor y, por lo tanto, requiere que el CAR alternativo se enganche en primer lugar para lograr la actividad completa del segundo (Lanitis E et al. Cancer Immunol Res. 2013; 1 (1): 43-53; Kloss CC et al. Nat Biotechnol. 2013; 31 (1): 71-5). Un segundo desafío para la generación de un único CAR basado en scFv como agente inmunoterapéutico es la heterogeneidad de las células tumorales. Al menos un grupo ha desarrollado una estrategia CAR para el glioblastoma mediante la que la población de células efectoras se dirige a múltiples antígenos (HER2, IL-13Ra, EphA2) al mismo tiempo con la esperanza de evitar la proliferación de poblaciones diana negativas al antígeno (Hegde M et al. Mol Ther. 2013; 21 (11): 2087-101).

La inmunoterapia basada en células T se ha convertido en una nueva frontera en biología sintética; se prevé que múltiples promotores y productos génicos dirijan estas células altamente potentes al microentorno tumoral, en el que las células T pueden eludir señales reguladoras negativas y mediar en la eliminación eficaz del tumor. La eliminación de células T no deseadas por medio de la dimerización inducida por fármacos de constructos de caspasa 9 inducibles con AP1903 muestra una forma en la que se puede iniciar farmacológicamente un potente interruptor que puede controlar las poblaciones de células T (Di Stasi A et al. N Engl J Med. 2011; 365 (18): 1673-83). La creación de poblaciones de células T efectoras que son inmunes a los efectos reguladores negativos del factor de crecimiento transformante β mediante la expresión de un receptor señuelo demuestra adicionalmente el grado en el que las células T efectoras pueden modicarse genéticamente para lograr una actividad antitumoral óptima (Foster AE et al. J Immunother. 2008; 31 (5): 500-5).

El documento US 2014/0112956 A1 describe un procedimiento *in vitro* para el cebado de células T CD4+ y/o CD8+ específicas de antígeno modificadas genéticamente adecuadas para su administración a un paciente que tiene un tumor. El procedimiento descrito en dicho documento incluye el cocultivo de células T diana que expresan el receptor de antígeno del paciente que se va a tratar, células dendríticas, anticuerpos anti-CD3 y linfocitos que se han sensibilizado frente a antígenos MHC de clase I y/o MHC de clase II en células presentadoras de antígeno.

Liechtenstein et al. revisan en Cancers, vol. 5, Nº 3, 2 de julio de 2013, en las páginas 815-837, vectores lentivirales para inmunoterapia del cáncer y aplicaciones clínicas.

Por lo tanto, aunque parece que los CAR pueden desencadenar la activación de las células T de forma similar a un receptor de células T endógeno, un impedimento importante para la aplicación clínica de esta tecnología basada en CAR ha sido hasta la fecha la expansión *in vivo* de las células T CAR+, la rápida desaparición de las células después de la infusión, la actividad clínica decepcionante y el tiempo indebido entre el diagnóstico y el tratamiento oportuno del cáncer con dichas células T CAR+.

En consecuencia, existe una necesidad urgente y desde hace tiempo percibida en la técnica de descubrir composiciones y procedimientos para el tratamiento del cáncer utilizando una terapia basada en CAR que pueda mostrar atributos terapéuticos esperados específicos del paciente sin los inconvenientes mencionados anteriormente.

La presente invención aborda estas necesidades proporcionando composiciones que comprenden células presentadoras de antígeno/células T autólogas transducidas con vector lentivírico cocultivadas y procedimientos de uso de las mismas en una terapia combinada específica del paciente que se puede utilizar para tratar cánceres y otras enfermedades y/o afecciones.

En particular, la presente invención, tal como se divulga y se describe en el presente documento, proporciona una composición que comprende células presentadoras de antígenos autólogas transducidas con vectores lentivirales que expresan antígenos cancerosos mutados codificados por tumor específicos del paciente, en la que las células se cocultivan con células T autólogas transducidas con receptores antigénicos quiméricos (CAR) expresados por vectores lentivirales, con o sin uno o más receptores de células T antigénicos tumorales derivados de biopsia tumoral y de sangre periférica expresados por lentivirales transducidos en la población de células T terapéuticas, para generar poblaciones de células T antitumorales activas específicas del paciente que se pueden infundir directamente en el paciente para promover la expansión *in vivo*, la persistencia de células T antitumorales específicas del paciente, lo que da como resultado la estabilización, la reducción y/o la eliminación del tumor y/o la remisión y/o la eliminación del cáncer de una forma específica del paciente.

Sumario de la invención

La presente invención está definida por las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes describen formas de realización adicionales de la invención.

En el presente documento se proporcionan composiciones de inmunoterapia adoptiva novedosas que comprenden células presentadoras de antígenos autólogas transducidas con vectores lentivirales y células T cocultivadas, así como procedimientos de uso de las mismas en una inmunoterapia combinada específica del paciente que se puede utilizar para tratar cánceres y otras enfermedades y afecciones.

Por lo tanto, en un aspecto, se proporcionan en el presente documento vectores lentivirales que expresan antígenos cancerosos mutados específicos del paciente, vectores lentivirales que expresan receptores de células T (TCR) nativos, vectores lentivirales que expresan transcritos de TCR de células T reactivas específicos de tumor y vectores lentivirales que expresan receptores antigénicos quiméricos (CAR), así como células huésped (por ejemplo, células T) que expresan los antígenos cancerosos mutados, los receptores de células T nativos, los transcritos de TCR de células T y los receptores, y moléculas de ácido nucleico que codifican los antígenos cancerosos mutados, los receptores de células T nativos, los transcritos de TCR de células T y los receptores. También se proporcionan procedimientos de uso de los vectores lentivirales divulgados que expresan antígenos cancerosos mutados específicos del paciente, vectores lentivirales que expresan receptores de células T (TCR) nativos, vectores lentivirales que expresan transcritos de TCR de células T reactivas específicos de tumor y vectores lentivirales que expresan receptores antigénicos quiméricos (CAR), células huésped y moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, para tratar un cáncer en un sujeto.

En un aspecto, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva que comprende una población de células T autólogas transducidas con uno o más vectores lentivirales que codifican un único o múltiples receptores antigénicos quiméricos (CAR), en la que la población de células T se transduce adicionalmente con uno o más vectores lentivirales que codifican receptores de células T (TCR) específicos de tumor, y en el que las células T se cocultivan con células presentadoras de antígeno autólogas transducidas con uno o más vectores lentivirales que expresan antígenos tumorales derivados del paciente generando así una población de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas capaces de promover la expansión *in vivo*, la persistencia de células T antitumorales específicas del paciente, lo que da como resultado la estabilización, la reducción y/o la eliminación del tumor y/o la remisión y/o la eliminación del cáncer de una forma específica del paciente.

En una forma de realización, las células presentadoras de antígenos autólogas se derivan de células dendríticas autólogas o células B o una mezcla de linfocitos derivados de sangre periférica.

En una forma de realización, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva en la que los antígenos tumorales derivados del paciente se identifican mediante biopsia del paciente y secuenciación de nucleótidos para identificar transcritos de ARN mutantes dentro del mutanoma.

En una forma de realización, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva en la que la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas comprenden células presentadoras de antígeno (APC) autólogas que comprenden células dendríticas o células B específicas del paciente, o una mezcla de linfocitos derivados de sangre periférica.

En otra forma de realización, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva en la que la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas comprenden células presentadoras de antígeno (APC) autólogas que comprenden células B autólogas específicas del paciente activas inmortalizadas con el virus de Epstein-Barr (EBV), en la que la etapa de inmortalización comprende el cultivo de células B autólogas con un sobrenadante de cultivo celular que contiene EBV. En una forma de realización, los servicios comerciales para la producción de dichas células B autólogas específicas del paciente activas inmortalizadas con EBV incluyen, por ejemplo, y no a modo de limitación, Applied Biologic Material, ABM, Inc., (https: //www.abmgood. com/EBV-Cell-Immortalization.html). En una forma de realización, la línea de células B inmortalizadas con EBV comprende la línea celular utilizada de forma rutinaria en la técnica que incluye, y no a modo de limitación, la línea de células B inmortalizadas con EBV B95-8 (ATCC CRL-1612, o alternativamente el sobrenadante que contiene EBV (ATCC-BR14-92).

En una forma de realización, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva en la que los receptores de células T (TCR) específicos de tumor se identificaron en primer lugar mediante cocultivo de células presentadoras de antígeno (APC) transducidas con uno o más vectores lentivirales que expresan antígenos tumorales derivados del paciente con las células T específicas del paciente o compatibles con HLA.

En una forma de realización, las células presentadoras de antígenos autólogas se derivan de células dendríticas autólogas o células B o una mezcla de linfocitos derivados de sangre periférica.

En una forma de realización, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva en la que los receptores de células T (TCR) específicos de tumor son compatibles con HLA o específicos del paciente.

En una forma de realización, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva en la que las células T autólogas específicas del paciente que contienen el receptor de células T (TCR) específico del paciente específico de tumor se transducen con un vector lentiviral para que expresen receptores antigénicos quiméricos (CAR) durante o después del cocultivo con células presentadoras de antígeno autólogas transducidas con uno o más vectores lentivirales que expresan antígenos tumorales derivados del paciente para generar una población de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas capaces de reconocer dichos receptores de células T (TCR) específicos de tumor y capaces de promover la expansión *in vivo*, la persistencia de células T antitumorales específicas del paciente, lo que da como resultado la estabilización, la reducción y/o la eliminación del tumor y/o la remisión y/o la eliminación del cáncer de una forma específica del paciente.

En una forma de realización, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva en la que los antígenos tumorales derivados del paciente se identifican mediante biopsia del paciente y secuenciación de nucleótidos para identificar trascritos de ARN mutantes dentro del mutanoma. En una forma de realización, la secuenciación de nucleótidos se realiza utilizando secuenciación de próxima generación.

En una forma de realización, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva en la que la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas comprenden células presentadoras de antígeno (APC) autólogas que comprenden células dendríticas o células B específicas del paciente, o una mezcla de linfocitos derivados de sangre periférica.

En determinadas formas de realización, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva en la que la población de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas se genera en un día, tres días, cinco días, siete días, diez días, catorce días, veintiún días, o un mes de biopsia tumoral y en la que la población de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas se puede infundir de nuevo en un paciente que padece cáncer y es capaz de promover la expansión *in vivo*, la persistencia de células T antitumorales específicas del paciente, lo que da como resultado la estabilización, la reducción y/o la eliminación del tumor y/o la remisión y/o la eliminación del cáncer de una forma específica del paciente.

En determinadas formas de realización del aspecto mencionado anteriormente, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva en la que el CAR comprende al menos un dominio de unión a antígeno extracelular, al menos un dominio enlazador, al menos un dominio transmembrana y al menos un dominio de señalización intracelular.

En determinadas formas de realización del aspecto mencionado anteriormente, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva en la que el, al menos un, dominio de unión a antígeno extracelular del CAR comprende al menos un fragmento variable monocatenario de un anticuerpo que se une al antígeno.

En determinadas formas de realización del aspecto mencionado anteriormente, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva en la que el, al menos un, dominio de unión a antígeno extracelular del CAR comprende al menos una región variable de cadena pesada de un anticuerpo que se une al antígeno.

En determinadas formas de realización del aspecto mencionado anteriormente, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva en la que el, al menos un, dominio de unión a antígeno extracelular del CAR, el, al menos un, dominio de señalización intracelular del CAR, o ambos están conectados al dominio transmembrana mediante un dominio enlazador o espaciador.

En determinadas formas de realización del aspecto mencionado anteriormente, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva en la que el dominio de unión a antígeno extracelular del CAR está precedido por un péptido líder.

En determinadas formas de realización del aspecto mencionado anteriormente, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva en la que el dominio de unión a antígeno extracelular del CAR se dirige a un antígeno que comprende CD19, CD20, CD22, ROR1, TSLPR, mesotelina, CD33, CD38, CD123 (IL3RA), CD138, BCMA (CD269), GPC2, GPC3, FGFR4, c-Met, PSMA, glicolípido F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR o cualquier combinación de los mismos.

En determinadas formas de realización del aspecto mencionado anteriormente, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva en la que el dominio de unión a antígeno extracelular del CAR comprende un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD19, un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD20, un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD22, un dominio de unión a antígeno scFV anti-ROR1, un dominio de unión a antígeno scFV anti-TSLPR, un dominio de unión a antígeno scFV anti-mesotelina, un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD33, un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD38, un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD123 (IL3RA), un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD138, un dominio de unión a antígeno scFV anti-BCMA (CD269), un dominio de unión a antígeno scFV anti-GPC2, un dominio de unión a antígeno scFV anti-GPC3, un dominio de unión a antígeno scFV anti-FGFR4,

un dominio de unión a antígeno scFV anti-c-Met, un dominio de unión a antígeno scFV anti-PSMA, un dominio de unión a antígeno scFV anti-glicolípido F77, un dominio de unión a antígeno scFV anti-EGFRvIII, un dominio de unión a antígeno scFV anti-GD-2, un dominio de unión a antígeno scFV anti-NY-ESo-1 TCR, un dominio de unión a antígeno scFV anti-MAGE A3 TCR, o una secuencia de aminoácidos con el 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.

En determinadas formas de realización del aspecto mencionado anteriormente, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva en la que el dominio enlazador o espaciador del CAR se deriva del dominio extracelular de CD8 y está enlazado al dominio transmembrana.

En determinadas formas de realización del aspecto mencionado anteriormente, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva en la que el CAR comprende además un dominio transmembrana que comprende un dominio transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, CD271, TNFRSF19 o cualquier combinación de los mismos.

En determinadas formas de realización del aspecto mencionado anteriormente, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva en la que el, al menos un, dominio de señalización intracelular comprende además un dominio intracelular CD3 zeta.

En determinadas formas de realización del aspecto mencionado anteriormente, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva en la que el, al menos un, dominio de señalización intracelular está dispuesto en un lado C-terminal con respecto al dominio intracelular CD3 zeta.

En determinadas formas de realización del aspecto mencionado anteriormente, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva en la que el, al menos un, dominio de señalización intracelular comprende un dominio coestimulador, un dominio de señalización primario o cualquier combinación de los mismos.

En determinadas formas de realización del aspecto mencionado anteriormente, se proporciona una composición de inmunoterapia adoptiva en la que el, al menos un, dominio coestimulador comprende un dominio de señalización funcional de OX40, CD70, CD27, CD28, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), DAP10, DAP12 y 4-1BB (CD137), o cualquier combinación de los mismos.

En el presente documento se divulgan moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican antígenos cancerosos mutados específicos del paciente, moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican receptores de células T (TCR) nativos, moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican transcritos de TCR de células T reactivas específicos de tumor, o moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican receptores antigénicos quiméricos (CAR).

Los CAR utilizados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas pueden modificarse para que expresen o para que contengan un marcador detectable para su uso en el diagnóstico, el seguimiento y/o la predicción del resultado del tratamiento, tal como la supervivencia libre de progresión de pacientes con cáncer o para controlar el progreso de dicho tratamiento.

En un ejemplo de los CAR utilizados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, la molécula de ácido nucleico que codifica los CAR descritos puede estar contenida en un vector, tal como un vector vírico. El vector es un vector de ADN, un vector de ARN, un vector de plásmido, un vector de cósmido, un vector de virus del herpes, un vector de virus del sarampión, un vector de lentivirus, un vector adenoviral o un vector de retrovirus, un virus endógeno de babuino (BaEV) o un combinación de los mismos.

En determinados ejemplos de los CAR utilizados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, los vectores lentivirales están pseudotipados con diferentes glicoproteínas (GP) víricas que incluyen, por ejemplo, y no a modo de limitación, virus de la leucemia murina anfotrópica [MLV-A], GP164, virus de la leucemia del mono gibón [GALV], RD114, GP derivadas de retrovirales del virus endógeno felino y virus de la estomatitis vesicular [VSV], virus del sarampión, virus de la peste aviar [FPV], virus del Ébola [EboV], virus de la coriomeningitis linfocítica [LCMV]) GP no derivadas de retrovirales, así como variantes quiméricas de los mismos que incluyen, por ejemplo, y no a modo de limitación, GP quiméricas que codifican los dominios extracelulares y transmembrana de GALV o GP de RD114 fusionadas a la cola citoplasmática (designadas TR) de GP de MLV-A.

En determinados ejemplos de los CAR utilizados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, el vector comprende además un promotor en los que el promotor es un promotor inducible, un promotor específico de tejido, un promotor constitutivo, un promotor suicida o cualquier combinación de los mismos.

En otros ejemplos más de los CAR utilizados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, el vector que expresa el CAR puede modificarse adicionalmente para que incluya uno o más elementos operativos para controlar la expresión de los CAR de células T, o para eliminar los CAR de células T en

virtud de un interruptor suicida. El interruptor suicida puede incluir, por ejemplo, una cascada de señalización inductora de apoptosis o un fármaco que induce la muerte celular. En una forma de realización preferida, el vector que expresa el CAR puede modificarse adicionalmente para que exprese una enzima tal como timidina quinasa (TK) o citosina desaminasa (CD).

En el presente documento se divulgan CAR utilizados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, células huésped que incluyen la molécula de ácido nucleico que codifica el CAR. En algunos ejemplos, la célula huésped es una célula T, tal como una célula T primaria obtenida de un sujeto. En un ejemplo, la célula huésped es una célula T CD8+.

En otro ejemplo más, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz antitumoral de una población de población o poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas de un ser humano que padece un cáncer, en el que el cáncer es un cáncer refractario que no responde a uno o más agentes quimioterapéuticos. El cáncer incluye cáncer hematopoyético, síndrome mielodisplásico, cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello, tumores cutáneos, enfermedad mínima residual (ERM) en leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de colon, melanoma u otro cáncer hematológico y tumores sólidos, o cualquier combinación de los mismos.

En otro ejemplo más, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz antitumoral de una población de población o poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas de un ser humano que padece un cáncer, en el que el cáncer incluye un cáncer hematológico, tal como leucemia (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML) o leucemia mieloide crónica (CML), linfoma (por ejemplo, linfoma de células del manto, linfoma no de Hodgkin o linfoma de Hodgkin) o mieloma múltiple, o cualquier combinación de los mismos.

En otro ejemplo más, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz antitumoral de una población de población o poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas de un ser humano que padece un cáncer, en el que el cáncer incluye un carcinoma adulto que comprende cáncer bucal y de faringe (lengua, boca, faringe, cabeza y cuello), cánceres del sistema digestivo (esófago, estómago, intestino delgado, colon, recto, ano, hígado, conducto biliar intrahepático, vesícula biliar, páncreas), cánceres del sistema respiratorio (laringe, pulmón y bronquios), cánceres de huesos y articulaciones, cánceres de tejidos blandos, cánceres de piel (melanoma, carcinoma de células basales y escamosas), tumores pediátricos (neuroblastoma, rabdomiosarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing), tumores del sistema nervioso central (cerebro, astrocitoma, glioblastoma, glioma) y cánceres de mama, del sistema genital (cuello uterino, cuerpo uterino, ovario, vulva, vagina, próstata, testículos, pene, endometrio), del sistema urinario (vejiga urinaria, riñón y pelvis renal, uréter), del ojo y de la órbita, del sistema endocrino (tiroides) y del cerebro y el resto del sistema nervioso, o cualquier combinación de los mismos.

En el presente documento se divulgan procedimientos para producir células T que contienen CAR antitumorales autólogas específicas del paciente activas. Los procedimientos incluyen la transducción de una célula T con un vector o molécula de ácido nucleico que codifica i) uno o más antígenos cancerosos mutados específicos del paciente; ii) uno o más TCR específicos del paciente y específicos de tumor; y iii) uno o más receptores antigénicos quiméricos (CAR), o cualquier combinación de los mismos, que se une específicamente a un antígeno, produciendo así células T que contienen CAR antitumorales autólogas específicas del paciente activas.

En el presente documento se divulga un procedimiento para generar una población de células T modificadas genéticamente con ARN que comprende la introducción de un ARN transcrito o ARN sintético *in vitro* de una molécula de ácido nucleico que codifica a i) uno o más antígenos cancerosos mutados específicos del paciente; ii) uno o más TCR específicos del paciente y específicos de tumor; y iii) uno o más receptores antigénicos quiméricos (CAR), o cualquier combinación de los mismos, en una célula de un sujeto, generando así una población de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas capaces de promover la expansión *in vivo*, la persistencia de células T antitumorales específicas del paciente, lo que da como resultado la estabilización, la reducción y/o la eliminación del tumor y/o la remisión y/o la eliminación del cáncer de una forma específica del paciente.

En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una población de células T autólogas transducidas con uno o más vectores lentivirales que codifican un único o múltiples receptores antigénicos quiméricos (CAR), en la que la población de células T se transduce adicionalmente con uno o más vectores lentivirales que codifican receptores de células T (TCR) específicos de tumor, y en la que las células T se cocultivan con células presentadoras de antígeno autólogas transducidas con uno o más vectores lentivirales que expresan antígenos tumorales derivados del paciente, generando así una población de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas capaces de promover la expansión *in vivo*, la persistencia de células T antitumorales específicas del paciente, lo que da como resultado la estabilización, la reducción y/o la eliminación del tumor y/o la remisión y/o la eliminación del cáncer de una forma específica del paciente.

En una forma de realización, se proporciona una composición farmacéutica en la que las células T son células T de un ser humano que padece un cáncer hematológico.

En otra forma de realización, se proporciona una composición farmacéutica en la que el cáncer hematológico es leucemia o un linfoma.

En otra forma de realización, se proporciona una composición farmacéutica en la que la leucemia es leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL) o leucemia mieloide crónica (CML).

En otra forma de realización, se proporciona una composición farmacéutica en la que el linfoma es linfoma de células del manto, linfoma no de Hodgkin o linfoma de Hodgkin.

En otra forma de realización, se proporciona una composición farmacéutica en la que el cáncer hematológico es mieloma múltiple. En otra forma de realización, se proporciona una composición farmacéutica en la que el cáncer humano incluye un carcinoma adulto que comprende cáncer bucal y de faringe (lengua, boca, faringe, cabeza y cuello), cánceres del sistema digestivo (esófago, estómago, intestino delgado, colon, recto, ano, hígado, conducto biliar intrahepático, vesícula biliar, páncreas), cánceres del sistema respiratorio (laringe, pulmón y bronquios), cánceres de huesos y articulaciones, cánceres de tejidos blandos, cánceres de piel (melanoma, carcinoma de células basales y escamosas), tumores pediátricos (neuroblastoma, rabdomiosarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing), tumores del sistema nervioso central (cerebro, astrocitoma, glioblastoma, glioma) y cánceres de mama, del sistema genital (cuello uterino, cuerpo uterino, ovario, vulva, vagina, próstata, testículos, pene, endometrio), del sistema urinario (vejiga urinaria, riñón y pelvis renal, uréter), del ojo y de la órbita, del sistema endocrino (tiroides) y del cerebro y el resto del sistema nervioso, o cualquier combinación de los mismos.

En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento para tratar a un mamífero que padece una enfermedad, trastorno o afección asociada con una expresión elevada de un antígeno tumoral, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto la composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz antitumoral de una población de células T autólogas transducidas con uno o más vectores lentivirales que codifican un único o múltiples receptores antigénicos quiméricos (CAR), en la que la población de células T se transduce adicionalmente con uno o más vectores lentivirales que codifican receptores de células T (TCR) específicos de tumor, y en la que las células T se cocultivan con células presentadoras de antígeno autólogas transducidas con uno o más vectores lentivirales que expresan antígenos tumorales derivados del paciente, generando así una población de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas capaces de promover la expansión *in vivo*, la persistencia de células T antitumorales específicas del paciente, lo que da como resultado la estabilización, la reducción y/o la eliminación del tumor y/o la remisión y/o la eliminación del cáncer de una forma específica del paciente.

En determinadas formas de realización, se proporciona en el presente documento un procedimiento en el que la célula T se ha preseleccionado en virtud de una activación específica de la expresión o marcadores de superficie asociados a la memoria.

En determinadas formas de realización, se proporciona en el presente documento un procedimiento en el que las células T y las células dendríticas se derivan de un donante de células madre hematopoyéticas, y en el que el procedimiento se lleva a cabo en el contexto de un trasplante de células madre hematopoyéticas.

En el presente documento se divulga un procedimiento para generar una población persistente de población o poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas modificadas genéticamente en un ser humano al que se ha diagnosticado cáncer. En un ejemplo, el procedimiento comprende administrar a un paciente humano que lo necesite una o más poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas descritas en el presente documento, en el que la población persistente de población o poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, o la población de progenie de las células T, persiste en el ser humano durante al menos un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, dos años o tres años después de la administración.

En un ejemplo, la progenie de células T en el ser humano comprende una célula T de memoria. En otra forma de realización, la célula T es una célula T autóloga.

En todos los aspectos y formas de realización de las composiciones para su uso en procedimientos de tratamiento de cualquiera de los cánceres, enfermedades, trastornos o afecciones asociados con una expresión elevada de un antígeno tumoral mencionadas anteriormente, estas pueden comprender una población o poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas divulgadas en el presente documento.

En el presente documento se divulga un kit para preparar una composición que comprende una población o poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas tal como se han descrito anteriormente para prevenir, tratar o mejorar cualquiera de los cánceres, enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con una expresión elevada de un antígeno tumoral en un sujeto tal como se ha descrito anteriormente, que comprende un recipiente que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico, vectores, células huésped o composiciones divulgadas anteriormente o cualquier combinación de los mismos, e instrucciones para utilizar el kit.

Se entenderá que la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, los vectores lentivirales que expresan antígenos cancerosos mutados específicos del paciente, vectores lentivirales que expresan receptores de células T (TCR) nativos, vectores lentivirales que expresan transcritos de TCR de células T reactivas específicos de tumor y vectores lentivirales que expresan receptores antigénicos quiméricos (CAR), así como células huésped (por ejemplo, células T) que expresan los antígenos cancerosos mutados, los receptores de células T nativos, los transcritos de TCR de células T y los receptores, y moléculas de ácido nucleico que codifican los antígenos cancerosos mutados, los receptores de células T nativos, los transcritos de TCR de células T y los receptores, células huésped y procedimientos descritos anteriormente son útiles más allá de los aspectos y formas de realización específicos que se describen en detalle en el presente documento. Las características y ventajas anteriores de la divulgación resultarán más evidentes a partir de la descripción detallada siguiente, que se proporciona con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La descripción detallada siguiente de las formas de realización preferidas de la invención se comprenderá mejor cuando se lea junto con los dibujos adjuntos. Con el fin de ilustrar la invención, se muestran en los dibujos formas de realización que son preferidas en la presente invención. Debe entenderse, sin embargo, que la invención no se limita a las disposiciones e instrumentos precisos de las formas de realización mostradas en los dibujos.

La figura 1 representa un primer procedimiento ejemplar para tratar cáncer, en el que las células T destinadas a inmunoterapia (reinfusión en el paciente) se transducen con un LV de expresión de CAR y se estimulan con su TCR nativo para que reconozcan proteínas mutantes específicas del paciente identificadas mediante secuenciación de próxima generación.

La figura 2 representa un segundo procedimiento ejemplar para tratar cáncer, en el que las células T destinadas a inmunoterapia (reinfusión en el paciente) se transducen con un LV de expresión de CAR y secuencias TCR derivadas de biopsia de tumor o sangre, y se estimulan mediante DC que expresan transcritos identificadas por secuenciación de próxima generación del tumor.

Descripción detallada

Definiciones

Tal como se utilizan en el presente documento, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" se refieren tanto al singular como al plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "un antígeno" incluye antígenos en singular o plural y puede considerarse equivalente a la frase "al menos un antígeno". Tal como se utiliza en el presente documento, el término "comprende" significa "incluye". Por lo tanto, "que comprende un antígeno" significa "que incluye un antígeno" sin excluir otros elementos. La frase "y/o" significa "y" u "o". Debe entenderse además que todos y cada uno de los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos, son aproximados y se proporcionan con fines descriptivos, a menos que se indique lo contrario. Aunque pueden utilizarse muchos procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados particulares. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las explicaciones de los términos. Además, los materiales, los procedimientos y los ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Para facilitar la revisión de las diversas formas de realización, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos:

El término "aproximadamente" cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, se pretende que abarque variaciones de +/-20%, +/-10%, o de forma más preferida +/- 5%, o +/- 1%, o de forma aún más preferida +/- 0,1% del valor especificado, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los procedimientos descritos.

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos de este documento se utilizan según su uso convencional. Se pueden encontrar definiciones de términos comunes en biología molecular en Benjamin Lewin, *Genes VII*, publicado por Oxford University Press, 1999; Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994; y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995; y otras referencias similares.

La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para tratar el cáncer que incluyen, pero sin limitación, neoplasias malignas hematológicas y tumores sólidos. La presente invención se refiere a una estrategia específica del paciente y específica de tumor de transferencia celular adoptiva de células T transducidas para que expresen un receptor antigénico quimérico (CAR).

La presente invención se refiere más particularmente a vectores lentivirales que expresan antígenos cancerosos mutados específicos del paciente, vectores lentivirales que expresan receptores de células T (TCR) nativos, vectores lentivirales que expresan transcritos de TCR de células T reactivas específicos de tumor y vectores lentivirales que

expresan receptores antigénicos quiméricos (CAR) que se proporcionan en el presente documento, así como células huésped (por ejemplo, células T) que expresan los antígenos cancerosos mutados, los receptores de células T nativos, los transcritos de TCR de células T y los receptores, y moléculas de ácido nucleico que codifican los antígenos cancerosos mutados, los receptores de células T nativos, los transcritos de TCR de células T y los receptores. También se proporcionan procedimientos de uso de los vectores lentivirales divulgados que expresan antígenos cancerosos mutados específicos del paciente, vectores lentivirales que expresan receptores de células T (TCR) nativos, vectores lentivirales que expresan transcritos de TCR de células T reactivas específicos de tumor y vectores lentivirales que expresan receptores antigénicos quiméricos (CAR), células huésped y moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, para tratar un cáncer en un sujeto.

De forma sorprendente e inesperada, los inventores han descubierto ahora que la población antitumoral de células T activas es más eficaz si, además de la expresión de un TCR específico de tumor (ya sea mediante selección de poblaciones de células T nativas o clonación molecular y transferencia del TCR específico de tumor mediante un vector lentiviral), viene acompañada de la expresión de un receptor antigénico quimérico (CAR). El CAR permite, de forma sorprendente e inesperada, la persistencia de la población de células T que porta el o los TCR específicos de tumor en virtud de la estimulación de esta población de células T al encontrar un autoantígeno (por ejemplo, CD19) cuya pérdida puede tolerarse por parte del paciente y, sin embargo, sirve para proporcionar una señal estimulante para la población celular terapéutica que no reside en el propio tejido tumoral. Dichas poblaciones de células T antitumorales específicas del paciente activas tal como se describen en el presente documento se pueden infundir directamente de nuevo en el paciente para promover la expansión *in vivo*, la persistencia de células T antitumorales específicas del paciente, lo que da como resultado la estabilización, la reducción y/o la eliminación del tumor y/o la remisión y/o la eliminación del cáncer de una forma específica del paciente.

Así, en su aspecto más amplio, la novedad de esta inmunoterapia adoptiva radica en el uso de vectores lentivirales para identificar los TCR del paciente mediante la transducción de APC con genes mutados específicos de tumor y después el cultivo con células T del paciente. Esto implica secuenciar e identificar los antígenos mutados en ese paciente y después expresar las proteínas mutadas en APC por medio de LV y cocultivar células T e identificar los TCR del paciente. A continuación, se pueden aislar y caracterizar los TCR y las células T específicos de mutatoma. Además, se añaden CAR para mejorar la respuesta inmunitaria (RI). La característica diferenciadora es que el CAR no es el principal agente de inmunoterapia, pero actúa aumentando la respuesta de TCR que es altamente específica. Aumenta la RI de dos formas distintas: en primer lugar, proporcionando a las células T una señal adicional para expandirse y sobrevivir en el cuerpo; y en segundo lugar, dirigiéndose a antígenos de células inmunosupresoras.

En otro aspecto, la novedad de esta inmunoterapia adoptiva radica en el uso de vectores lentivirales para identificar TCR específicos de tumor derivados del paciente mediante la transducción de APC con genes mutantes codificados por tumor utilizando LV y después el cultivo con células del paciente. Esto implica la secuenciación y la identificación de los antígenos mutados de los pacientes y después la expresión de la proteína mutada en APC por medio de LV y cocultivo de células T del paciente para identificar TCR específicos de mutanoma. En otro aspecto, los CAR se utilizan para mejorar la respuesta inmunitaria al tumor mediada por la población de células T terapéuticas. La respuesta inmunitaria se mejora de al menos tres formas. En primer lugar, al proporcionar a las células T una señal adicional para expandirse y sobrevivir en el cuerpo, el CAR permite la persistencia de la población de células T terapéuticas que portan los TCR específicos de tumor en virtud de la estimulación de la población de células T al encontrar un autoantígeno (por ejemplo CD19), cuya pérdida puede tolerarse por parte del paciente y, sin embargo, sirve para proporcionar una señal estimulante para la población celular terapéutica que no reside en el propio tejido tumoral. En un segundo aspecto, el CAR puede dirigirse a tipos de células distintos del tumor que median los efectos inmunosupresores. Por ejemplo, si están presentes células B que expresan CD19 en la lesión tumoral y también median un efecto antitumoral, el segundo beneficio para la población de células T específicas de tumor que expresan CAR es que también se elimina la población de células inmunosupresoras. En un tercer aspecto, el CAR se dirige a una población inmunosupresora que se encuentra distal con respecto al tumor, es decir, está presente en otro compartimento del cuerpo. Por ejemplo, el uso de un CAR que se dirige a las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), que pueden estar presentes tanto en la propia lesión tumoral como en los ganglios linfáticos regionales o la médula ósea.

Lo siguiente es una descripción detallada de los CAR que pueden usarse en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas divulgadas en el presente documento, incluida una descripción de su dominio extracelular, el dominio transmembrana y el dominio intracelular, junto con una descripción adicional de CAR, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, conjugados, nucleótidos, expresión, vectores y células huésped, procedimientos de tratamiento, composiciones y kits que emplean los CAR divulgados.

A. Receptores antigénicos quiméricos (CAR)

Los CAR divulgados en el presente documento comprenden al menos un dominio extracelular capaz de unirse a un antígeno, al menos un dominio transmembrana y al menos un dominio intracelular.

Un receptor antigénico quimérico (CAR) es una proteína o polipéptido híbrido construido artificialmente que contiene los dominios de unión a antígeno de un anticuerpo (por ejemplo, un fragmento variable monocatenario (scFv))

enlazado a dominios de señalización de células T a través de un dominio transmembrana. Las características de los CAR incluyen su capacidad para redirigir la especificidad y la reactividad de las células T hacia una diana seleccionada de una forma no restringida por MHC, y explotar las propiedades de unión a antígeno de los anticuerpos monoclonales. El reconocimiento de antígenos no restringido por MHC proporciona a las células T que expresan CAR la capacidad de reconocer el antígeno independientemente del procesamiento del antígeno, evitando así un mecanismo principal de escape tumoral. Además, cuando se expresan en células T, los CAR, ventajosamente, no se dimerizan con cadenas alfa y beta del receptor de células T (TCR) endógeno.

Tal como se divulga en el presente documento, los dominios de señalización de células T intracelulares de los CAR pueden incluir, por ejemplo, un dominio de señalización del receptor de células T, un dominio de señalización coestimulador de células T, o ambos. El dominio de señalización del receptor de células T se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de un receptor de células T, tal como, por ejemplo, y no a modo de limitación, la porción intracelular de la proteína CD3 zeta. El dominio de señalización coestimulador se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora, que es una molécula de la superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que se requieren para una respuesta eficaz de los linfocitos al antígeno.

1. Dominio extracelular

En una forma de realización, el CAR utilizado en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas tal como se divulga en el presente documento, comprende un elemento de unión específico de la diana denominado de otro modo un dominio o resto de unión a antígeno. La elección del dominio depende del tipo y el número de ligandos que definen la superficie de una célula diana. Por ejemplo, puede elegirse el dominio de unión a antígeno de forma que reconozca un ligando que actúa como marcador de superficie celular en las células diana asociadas con un estado de enfermedad particular. Así, los ejemplos de marcadores de superficie celular que pueden actuar como ligandos para el dominio de unión a antígeno en el CAR incluyen los asociados con infecciones víricas, bacterianas y parasitarias, enfermedades autoinmunitarias y células cancerosas.

En una forma de realización, el CAR puede modificarse genéticamente para que se dirija a un antígeno tumoral de interés manipulando genéticamente un dominio de unión a antígeno deseado que se une específicamente a un antígeno en una célula tumoral. Los antígenos tumorales son proteínas producidas por células tumorales que provocan una respuesta inmunitaria, en particular respuestas inmunitarias mediadas por células T. La selección del dominio de unión a antígeno dependerá del tipo particular de cáncer que se va a tratar. Los antígenos tumorales son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, un antígeno asociado a glioma, antígeno carcinoembrionario (CEA), gonadotropina coriónica humana beta, alfafetoproteína (AFP), AFP reactiva a lectina, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CA IX, telomerasa transcriptasa inversa humana, RU1, RU2 (AS), carboxil-esterasa intestinal, mut hsp70-2, M-CSF, prostasa, antígeno específico de próstata (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, prosteína, PSMA, Her2/neu, survivina y telomerasa, antígeno tumoral de carcinoma de próstata-1 (PCTA-1), MAGE, ELF2M, elastasa de neutrófilos, efrinaB2, CD22, factor de crecimiento de insulina (IGF)-I, IGF-II, receptor de IGF-I y mesotelina. Los antígenos tumorales divulgados en el presente documento se incluyen simplemente a modo de ejemplo. No se pretende que la lista sea exclusiva y otros ejemplos serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

En una forma de realización, el antígeno tumoral comprende uno o más epítopos antigénicos de cáncer asociados con un tumor maligno. Los tumores malignos expresan una serie de proteínas que pueden servir como antígenos diana para un ataque inmunológico. Estas moléculas incluyen, pero sin limitación, antígenos específicos de tejido tales como MART-1, tirosinasa y GP 100 en melanoma y fosfatasa de ácido prostático (PAP) y antígeno específico de próstata (PSA) en cáncer de próstata. Otras moléculas diana pertenecen al grupo de moléculas relacionadas con la transformación, tales como el oncogén HER-2/Neu/ErbB-2. Otro grupo más de antígenos diana son antígenos onco-fetales tales como el antígeno carcinoembrionario (CEA). En el linfoma de células B, el idiotipo de inmunoglobulina específico de tumor constituye un antígeno de inmunoglobulina verdaderamente específico de tumor que es exclusivo del tumor individual. Los antígenos de diferenciación de células B tales como CD19, CD20, CD22 y CD37 son otros candidatos para antígenos diana en el linfoma de células B. Algunos de estos antígenos (CEA, HER-2, CD19, CD20, CD22, idiotipo) se han utilizado como dianas para inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales con un éxito limitado.

El tipo de antígeno tumoral también puede ser un antígeno específico de tumor (TSA) o un antígeno asociado a tumor (TAA). Un TSA es exclusivo de las células tumorales y no se produce en otras células del cuerpo. Un TAA no es exclusivo de una célula tumoral, sino que también se expresa en una célula normal en condiciones que no inducen un estado de tolerancia inmunológica al antígeno. La expresión del antígeno en el tumor puede tener lugar en condiciones que permitan al sistema inmunológico responder al antígeno. Los TAA pueden ser antígenos que se expresan en células normales durante el desarrollo fetal cuando el sistema inmunológico es inmaduro e incapaz de responder, o pueden ser antígenos que normalmente están presentes en niveles extremadamente bajos en células normales pero que se expresan en niveles mucho más altos en células tumorales.

Los ejemplos no limitantes de TSA o TAA incluyen los siguientes: antígenos de diferenciación tales como MART-1/MelanA (MART-I), gp100 (Pmel 17), tirosinasa, TRP-1, TRP-2 y antígenos multilinaje específicos de tumor tales

como MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; antígenos embrionarios sobreexpresados tales como CEA; oncogenes sobreexpresados y genes supresores de tumores mutados tales como p53, Ras, HER-2/neu; antígenos tumorales únicos resultantes de translocaciones cromosómicas; tales como BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; y antígenos víricos, tales como los antígenos EBVA del virus de Epstein Barr y los antígenos E6 y E7 del virus del papiloma humano (VPH). Otros antígenos grandes basados en proteínas incluyen TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, beta-catenina, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, alfa-fetoproteína, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27.29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\P1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90\proteína de unión a Mac-2\proteína asociada a ciclofilina C, TAAL6, TAG72, TLP y TPS.

En una forma de realización preferida, la porción del dominio de unión a antígeno del CAR se dirige a un antígeno que incluye, pero sin limitación, CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33, c-Met, PSMA, glicolípido F77, EGFRvIII, GD-2, MY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR y similares.

Dependiendo del antígeno deseado al que se dirija, el CAR puede diseñarse genéticamente para que incluya el dominio de unión a antígeno apropiado que sea específico para el antígeno diana deseado. Por ejemplo, si CD19 es el antígeno deseado al que se va a dirigir, se puede utilizar un anticuerpo para CD19 como incorporación del dominio de unión a antígeno en el CAR.

En una forma de realización ejemplar, la porción del dominio de unión a antígeno del CAR se dirige a CD19. Preferentemente, el dominio de unión a antígeno en el CAR es anti-CD19 scFV, en el que la secuencia de ácido nucleico del anti-CD19 scFV comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 27. En una forma de realización, el anti-CD19 scFV comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28. En otra forma de realización, la porción de scFV anti-CD19 del CAR comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 28.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un CAR capaz de unirse a un antígeno no TSA o no TAA que incluye, por ejemplo, y no a modo de limitación, un antígeno derivado de Retroviridae (por ejemplo, virus de inmunodeficiencia humana tales como VIH-1 y VIH-LP), Picornaviridae (por ejemplo, poliovirus, virus de la hepatitis A, enterovirus, virus de Coxsackie humano, rinovirus y echovirus), virus de la rubéola, coronavirus, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia, virus del Ébola, virus paragripal, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio, virus de la gripe, virus de la hepatitis B, parvovirus, Adenoviridae, Herpesviridae [por ejemplo, virus del herpes simple (HSV) tipo 1 y tipo 2, virus varicela-zoster, citomegalovirus (CMV) y virus del herpes], Poxviridae (por ejemplo, virus de la viruela, virus de la vacuna y poxvirus), o virus de la hepatitis C o cualquier combinación de los mismos .

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un CAR capaz de unirse a un antígeno derivado de una cepa bacteriana de Staphylococci, Streptococcus, Escherichia coli, Pseudomonas o Salmonella. En particular, se proporciona un CAR capaz de unirse a un antígeno derivado de una bacteria infecciosa, por ejemplo, Helicobacter pyloris, Legionella pneumophilia, una cepa bacteriana de Mycobacteria sp. (por ejemplo, M. tuberculosis, M. avium, M. intracellulare, M. kansaii o M. gordonea), Staphylococcus aureus, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitides, Listeria monocytogenes, Streptococcus pyogenes, Streptococcus del grupo A, Streptococcus del grupo B (Streptococcus areptococcus), Streptococcus pneumoniae o Clostridium tetani, o una combinación de los mismos.

2. Dominio transmembrana

En los CAR utilizados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas tal como se divulgan en el presente documento, el CAR comprende uno o más dominios transmembrana fusionados al dominio extracelular del CAR.

En una forma de realización, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada en la que el dominio enlazador codificado se deriva del dominio extracelular de CD8 y está unido al dominio transmembrana.

En una forma de realización, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada en la que el dominio enlazador codificado se deriva del dominio extracelular del dominio transmembrana y está unido al dominio transmembrana.

En algunos casos, el dominio transmembrana se puede seleccionar o mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas proteínas de la superficie de la membrana o de proteínas diferentes para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

El dominio transmembrana puede derivarse de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivarse de cualquier proteína transmembrana o unida a la membrana. Las regiones transmembrana de uso particular en la presente invención pueden derivarse de (es decir, comprenden al menos la o las regiones transmembrana de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, CD271, TNFRSF19. Alternativamente,

el dominio transmembrana puede ser sintético, en cuyo caso comprenderá residuos predominantemente hidrófobos tales como leucina y valina. Preferentemente, se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético. Opcionalmente, un enlazador oligopéptido o polipéptido corto, preferentemente de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización citoplásmico del CAR. Un doblete de glicina-serina proporciona un enlazador particularmente adecuado.

En una forma de realización, el dominio transmembrana del CAR de la invención es el dominio transmembrana CD8. En una forma de realización, el dominio transmembrana CD8 comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 11. En una forma de realización, el dominio transmembrana CD8 comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En otra forma de realización, el dominio transmembrana CD8 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En algunos casos, el dominio transmembrana del CAR comprende el dominio bisagra CD8.alfa. En una forma de realización, el dominio bisagra CD8 comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 13. En una forma de realización, el dominio bisagra CD8 comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En otra forma de realización, el dominio bisagra CD8 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

Sin pretender limitarse a ningún mecanismo de acción particular, se cree que las posibles razones para la obtención de una función terapéutica mejorada asociada con los CAR ejemplares utilizados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas tal como se divulgan en el presente documento de la invención incluyen, por ejemplo, y no a modo de limitación, a) movimiento lateral mejorado dentro de la membrana plasmática que permite una transducción de señales más eficaz, b) ubicación superior dentro de microdominios de la membrana plasmática, tales como balsas lipídicas, y mayor capacidad para interactuar con cascadas de señalización transmembrana asociadas con la activación de células T, c) ubicación superior dentro de la membrana plasmática por movimiento preferencial lejos de interacciones amortiguadoras o moduladoras a la baja, tales como una menor proximidad o interacción con fosfatasas tales como CD45, y d) ensamblaje superior en complejos de señalización del receptor de células T (es decir, la sinapsis inmunitaria), o cualquier combinación de los mismos.

En una forma de realización de la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas tal como se divulgan en el presente documento, los dominios transmembrana ejemplares no limitantes para su uso en los CAR divulgados en el presente documento incluyen los dominios transmembrana TNFRSF 16 y TNFRSF 19 que pueden utilizarse para derivar los dominios transmembrana TNFRSF y/o dominios enlazadores o espaciadores tal como se divulgan en la solicitud de patente provisional en trámite del solicitante Nº 62/239.509, titulada CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS AND METHODS OF USE, tal como se presentó el 9 de octubre de 2015, y se le asignó el número de referencia LEN_015PRO de Miltenyi Biotech Technology, Inc., incluidos, en particular, aquellos otros miembros de TNFRSF incluidos en la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral enumerados en la tabla I de la misma.

3. Dominio espaciador

En los CAR utilizados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas tal como se divulgan en el presente documento, se puede disponer un dominio espaciador entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana de TNFRSF, o entre el dominio intracelular y el dominio transmembrana TNFRSF. El dominio espaciador significa cualquier oligopéptido o polipéptido que sirva para unir el dominio transmembrana de TNFRSF con el dominio extracelular y/o el dominio transmembrana de TNFRSF con el dominio intracelular. El dominio espaciador comprende hasta 300 aminoácidos, preferentemente de 10 a 100 aminoácidos y de la forma más preferida de 25 a 50 aminoácidos.

En varias formas de realización, el enlazador puede incluir un elemento espaciador que, cuando está presente, aumenta el tamaño del enlazador de forma que se aumenta la distancia entre la molécula efectora o el marcador detectable y el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Los espaciadores ejemplares son conocidos por el experto en la técnica, e incluyen los enumerados en las patentes de Estados Unidos Nº 7.964.566, 7.498.298, 6.884.869, 6.323.315, 6.239.104, 6.034.065, 5.780.588, 5.665.860, 5.663.149, 5.635.483, 5.599.902, 5.554.725, 5.530.097, 5.521.284, 5.504.191, 5.410.024, 5.138.036, 5.076.973, 4.986.988, 4.978.744, 4.879.278, 4.816.444 y 4.486.414, así como en las publicaciones de patente de Estados Unidos Nº 20110212088 y 20110070248.

El dominio espaciador tiene preferentemente una secuencia que promueve la unión de un CAR con un antígeno y mejora la señalización en una célula. Los ejemplos de un aminoácido que se espera que promueva la unión incluyen cisteína, un aminoácido cargado y serina y treonina en un sitio de glicosilación potencial, y estos aminoácidos pueden utilizarse como un aminoácido que constituye el dominio espaciador.

Como dominio espaciador, puede utilizarse la totalidad o parte de los aminoácidos números 118 a 178 (SEQ ID NO: 15) que es una región bisagra de CD8.alfa. (NCBI RefSeq: NP-001759.3), aminoácidos números 135 a 195 de CD8.beta. (GenBank: AAA35664.1), aminoácidos números 315 a 396 de CD4 (NCBI RefSeq: NP.sub.-- 000607.1), o

aminoácidos números 137 a 152 de CD28 (NCBI RefSeq: NP.sub.-- 006130.1). Además, como dominio espaciador, puede utilizarse una parte de una región constante de una cadena H o cadena L de un anticuerpo (región CH1 o región CL, por ejemplo, un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 16). Además, el dominio espaciador puede ser una secuencia sintetizada artificialmente.

Además, en el CAR, una secuencia de péptido señal se puede unir al extremo N-terminal. La secuencia del péptido señal existe en el extremo N de muchas proteínas secretoras y proteínas de membrana, y tiene una longitud de 15 a 30 aminoácidos. Dado que muchas de las moléculas de proteína mencionadas anteriormente como dominio intracelular tienen secuencias de péptidos señal, los péptidos señal pueden utilizarse como péptidos señal para el CAR. En una forma de realización, el péptido señal comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6).

4. Dominio intracelular

El dominio citoplásmico o, de otra forma, el dominio de señalización intracelular del CAR es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la que se ha dispuesto el CAR. El término "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de una célula T, por ejemplo, puede ser actividad citolítica o actividad cooperadora, incluida la secreción de citocinas. Por lo tanto, el término "dominio de señalización intracelular" se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y dirige a la célula para que realice una función especializada. Aunque normalmente se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario utilizar la cadena completa. En la medida en que se utilice una parte truncada del dominio de señalización intracelular, dicha parte truncada se puede utilizar en lugar de la cadena intacta siempre que transduzca la señal de función efectora. Por lo tanto, se pretende que el término dominio de señalización intracelular incluya cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función efectora.

Los ejemplos preferidos de dominios de señalización intracelular para su uso en el CAR incluyen las secuencias citoplásmicas del receptor de células T (TCR) y los correceptores que actúan coordinadamente para iniciar la transducción de señales después del enganche del receptor antigénico, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional.

Se sabe que las señales generadas a través del TCR por sí solas son insuficientes para la activación completa de la célula T y que también se requiere una señal secundaria o coestimuladora. Por lo tanto, se puede decir que la activación de las células T está mediada por dos clases distintas de secuencias de señalización citoplasmática: las que inician la activación primaria dependiente del antígeno a través del TCR (secuencias de señalización citoplasmática primaria) y las que actúan de manera independiente al antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplásmicas secundarias).

Las secuencias de señalización citoplásmicas primarias regulan la activación primaria del complejo TCR de forma estimulante o de forma inhibidora. Las secuencias de señalización citoplásmicas primarias que actúan de forma estimulante pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina o ITAM.

Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplásmicas primarias que son de uso particular en los CAR descritos en el presente documento incluyen los derivados de TCR zeta (CD3 Zeta), FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. Los ejemplos específicos, no limitantes, del ITAM incluyen péptidos que tienen secuencias de aminoácidos números 51 a 164 de CD3.zeta. (NCBIRefSeq: NP.sub.-932170.1), aminoácidos números 45 a 86 de Fc.épsilon.RI.gamma. (NCBI RefSeq: NP.sub.-004097.1), aminoácidos números 201 a 244 de Fc.épsilon.RI.beta. (NCBI RefSeq: NP.sub-000130.1), aminoácidos números 139 a 182 de CD3.gamma. (NCBI RefSeq: NP-000064.1), aminoácidos números 128 a 171 de CD3.delta. (NCBI RefSeq: NP-000723.1), aminoácidos números 153 a 207 de CD3.épsilon. (NCBI RefSeq: NP-000724.1), aminoácidos números 402 a 495 de CD5 (NCBI RefSeq: NP. sub- 055022.2), aminoácidos números 707 a 847 de 0022 (NCBI RefSeq: NP.sub. -001762.2), aminoácidos números 166 a 226 de CD79a (NCBI RefSeq: NP. sub - 001774.1), aminoácidos números 182 a 229 de CD79b (NCBI RefSeq: NP. sub - 000617.1), y aminoácidos números 177 a 252 de CD66d (NCBI RefSeq: NP. sub-001806.2), y sus variantes tienen la misma función que tienen estos péptidos. El número de aminoácidos basado en la información de la secuencia de aminoácidos de NCBI RefSeq ID o GenBank descrito en el presente documento se numera en función de la longitud completa del precursor (que comprende una secuencia de péptido señal, etc.) de cada proteína. En una forma de realización, la molécula de señalización citoplásmica del CAR comprende una secuencia de señalización citoplásmica derivada de CD3 zeta.

En una forma de realización preferida, el dominio intracelular del CAR puede diseñarse de forma que comprenda el dominio de señalización de CD3-zeta por sí mismo o combinado con cualquier otro dominio citoplásmico deseado útil en el contexto del CAR. Por ejemplo, el dominio intracelular del CAR puede comprender una parte de la cadena CD3 zeta y una región de señalización coestimuladora. La región de señalización coestimuladora se refiere a una parte del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de la superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que se requiere para una respuesta

eficaz de los linfocitos a un antígeno. Los ejemplos de dichas moléculas coestimuladoras incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y un ligando que se une específicamente con CD83 y similares. Los ejemplos específicos, no limitantes, de dichas moléculas coestimuladoras incluyen péptidos que tienen secuencias de aminoácidos números 236 a 351 de CD2 (NCBI RefSeq: NP. sub .- 001758.2), aminoácidos números 421 a 458 de CD4 (NCBI RefSeq: NP. sub- 000607.1), aminoácidos números 402 a 495 de CD5 (NCBI RefSeq: NP. sub-055022.2), aminoácidos números 207 a 235 de CD8.alfa. (NCBI RefSeq: NP-001759.3), aminoácidos números 196 a 210 de CD83 (GenBank: AAA35664.1), aminoácidos números 181 a 220 de CD28 (NCBI RefSeq: NP-006130.1), aminoácidos números 214 a 255 de CD137 (4-1BB, NCBI RefSeq: NP-001552.2), aminoácidos números 241 a 277 de CD134 (OX40, NCBI RefSeq: NP. sub-003318.1), y aminoácidos números 166 a 199 de ICOS (NCBI RefSeq: NP. sub-036224.1), y sus variantes que tienen la misma función que tienen estos péptidos. Por lo tanto, aunque la divulgación del presente documento se ejemplifica principalmente con 4-1BB como elemento de señalización coestimulador, otros elementos coestimuladores se encuentran dentro del alcance de la divulgación.

Las secuencias de señalización citoplasmática dentro de la parte de señalización citoplásmica del CAR pueden estar enlazadas entre sí en un orden aleatorio o especificado. Opcionalmente, un enlazador oligopéptido o polipéptido corto, preferentemente de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace. Un doblete de glicina-serina proporciona un enlazador particularmente adecuado.

En una forma de realización, el dominio intracelular está diseñado de forma que comprenda el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28. En otra forma de realización, el dominio intracelular está diseñado de forma que comprenda el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB. En otra forma de realización más, el dominio intracelular está diseñado de forma que comprenda el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28 y 4-1BB.

En una forma de realización, el dominio intracelular del CAR está diseñado de forma que comprenda el dominio de señalización de 4-1BB y el dominio de señalización de CD3-zeta, en el que el dominio de señalización de 4-1BB comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 17 y el dominio de señalización de CD3-zeta comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 19.

En una forma de realización, el dominio intracelular en el CAR está diseñado de forma que comprenda el dominio de señalización de 4-1BB y el dominio de señalización de CD3-zeta, en el que el dominio de señalización de 4-1BB comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y el dominio de señalización de CD3-zeta comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

En una forma de realización, el dominio intracelular en el CAR está diseñado de forma que comprenda el dominio de señalización de 4-1BB y el dominio de señalización de CD3-zeta, en el que el dominio de señalización de 4-1BB comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18 y el dominio de señalización de CD3-zeta comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 20.

5. Descripción adicional de los CAR

También se incluyen expresamente dentro del alcance de la invención las porciones funcionales de los CAR utilizados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas tal como se divulgan en el presente documento. El término "porción funcional" cuando se utiliza con referencia a un CAR se refiere a cualquier parte o fragmento de uno o más de los CAR divulgados en el presente documento, parte o fragmento que retiene la actividad biológica del CAR del que forma parte (el CAR parental). Las porciones funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas partes de un CAR que conservan la capacidad de reconocer las células diana, o detectar, tratar o prevenir una enfermedad, en una medida similar, en la misma medida o en una medida superior al CAR parental. En referencia al CAR principal, la parte funcional puede comprender, por ejemplo, aproximadamente el 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95% o más del CAR principal.

La porción funcional puede comprender aminoácidos adicionales en el extremo amino-terminal o carboxi-terminal de la porción, o en ambos extremos, aminoácidos adicionales que no se encuentran en la secuencia de aminoácidos del CAR parental. De forma deseable, los aminoácidos adicionales no interfieren con la función biológica de la porción funcional, por ejemplo, reconocen las células diana, detectan el cáncer, tratan o previenen el cáncer, etc. De forma más deseable, los aminoácidos adicionales mejoran la actividad biológica, en comparación con la actividad biológica del CAR parental.

En el alcance de la divulgación se incluyen variantes funcionales de los CAR divulgados en el presente documento. El término "variante funcional", tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un CAR, polipéptido o proteína que tiene una identidad o similitud de secuencia sustancial o significativa con un CAR parental, variante funcional que retiene la actividad biológica del CAR del cual es una variante. Las variantes funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas variantes del CAR descritas en el presente documento (el CAR parental) que conservan la capacidad de reconocer células diana en una medida similar, la misma medida o en una medida superior al CAR parental. En

referencia al CAR parental, la variante funcional puede, por ejemplo, tener una secuencia al menos aproximadamente el 30%, 50%, 75%, 80%, 90%, 98%, o más, de aminoácidos idéntica al CAR parental.

Una variante funcional puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del CAR parental con al menos una sustitución conservadora de aminoácidos. Como alternativa, o adicionalmente, las variantes funcionales pueden comprender la secuencia de aminoácidos del CAR parental con al menos una sustitución de aminoácidos no conservadora. En este caso, se prefiere que la sustitución de aminoácidos no conservadora no interfiera con la actividad biológica de la variante funcional o la inhiba. La sustitución de aminoácidos no conservadora puede mejorar la actividad biológica de la variante funcional, de forma que la actividad biológica de la variante funcional aumente en comparación con el CAR parental.

Las sustituciones de aminoácidos de los CAR son preferentemente sustituciones de aminoácidos conservadoras. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son conocidas en la técnica e incluyen sustituciones de aminoácidos en las que un aminoácido que tiene determinadas propiedades físicas y/o químicas se intercambia por otro aminoácido que tiene propiedades químicas o físicas iguales o similares. Por ejemplo, la sustitución de aminoácidos conservadora puede ser un aminoácido polar ácido/cargado negativamente sustituido por otro aminoácido polar ácido/cargado negativamente (por ejemplo, Asp o Glu), un aminoácido con una cadena lateral no polar sustituida por otro aminoácido con una cadena lateral no polar (por ejemplo, Ala, Gly, Val, He, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Cys, Val, etc.), un aminoácido polar básico/cargado positivamente sustituido por otro amino polar básico/cargado positivamente ácido (por ejemplo, Lys, His, Arg, etc.), un aminoácido no cargado con una cadena lateral polar sustituido por otro aminoácido no cargado con una cadena lateral polar (por ejemplo, Asn, Gin, Ser, Thr, Tyr, etc.), un aminoácido con una cadena lateral ramificada beta sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral ramificada beta (por ejemplo, He, Thr y Val), un aminoácido con una cadena lateral aromática sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral aromática (por ejemplo, His, Phe, Trp y Tyr), etc.

El CAR puede consistir esencialmente en la secuencia o secuencias de aminoácidos especificadas descritas en el presente documento, de forma que otros componentes, por ejemplo, otros aminoácidos, no cambien materialmente la actividad biológica de la variante funcional.

Los CAR (incluidas las porciones funcionales y las variantes funcionales) pueden tener cualquier longitud, es decir, pueden comprender cualquier número de aminoácidos, siempre que los CAR (o porciones funcionales o variantes funcionales de los mismos) conserven su actividad biológica, por ejemplo, la capacidad de unirse específicamente al antígeno, detectar células enfermas en un mamífero o tratar o prevenir una enfermedad en un mamífero, etc. Por ejemplo, el CAR puede tener de aproximadamente 50 a aproximadamente 5000 aminoácidos de longitud, tal como 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más aminoácidos de longitud.

Los CAR (que incluyen porciones funcionales y variantes funcionales de la invención) pueden comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos naturales. Dichos aminoácidos sintéticos son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ácido aminociclohexano-carboxílico, norleucina, ácido amino-n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometilcisteína, trans-3- y trans-4-hidroxiprolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina, β-fenilserina, β-hidroxifenilalanina, fenilglicina, a-naftilalanina, ciclohexilalanina, ciclohexilglicina, ácido indolina-2-carboxílico 1,2,3,4,-tetrahidroxílico, ácido carboxílico, ácido aminomalónico, monoamida de ácido aminomalónico, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, ornitina, ácido aminociclopentanocarboxílico, ácido a-aminociclohexano-carboxílico, ácido a-aminocicloheptano-carboxílico, ácido a-(2-amino-2-norbornano)-carboxílico, ácido γ-diaminobutírico, ácido β-diaminopropiónico, homofenilalanina y a-terc-butilglicina.

Los CAR (incluidas las porciones funcionales y las variantes funcionales) pueden glicosilarse, amidarse, carboxilarse, fosforilarse, esterificarse, N-acilarse, ciclarse mediante, por ejemplo, un puente disulfuro, o convertirse en una sal de adición de ácido y/o opcionalmente dimerizarse o polimerizarse, o conjugarse.

Los CAR (incluidas las porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos) se pueden obtener mediante procedimientos conocidos en la técnica. Los CAR se pueden preparar mediante cualquier procedimiento adecuado para preparar polipéptidos o proteínas. Procedimientos adecuados para sintetizar *de novo* polipéptidos y proteínas se describen en referencias, tales como Chan et al., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2000; Peptide and Protein Drug Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2001, y la patente de Estados Unidos Nº 5.449.752. Los procedimientos para generar receptores antigénicos quiméricos, células T que incluyen dichos receptores y su uso (por ejemplo, para el tratamiento del cáncer) son conocidos en la técnica y se describen adicionalmente en el presente documento (véase, por ejemplo, Brentjens et al., 2010, Molecular Therapy, 18:4, 666-668; Morgan et al., 2010, Molecular Therapy, publicado en línea el 23 de febrero de 2010, páginas 1-9; Till et al., 2008, Blood, 1 12:2261 -2271; Park et al., Trends Biotechnol., 29:550-557, 2011; Grupp et al., N Engl J Med., 368:1509-1518, 2013; Han et al., J. Hematol Oncol., 6:47, 2013; Tumaini et al., Cytotherapy, 15, 1406-1417, 2013; Haso et al., (2013) Blood, 121, 1165-1174; las publicaciones PCT WO2012/079000, WO2013/126726; y la publicación de Estados Unidos Nº 2012/0213783). Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de unión a antígeno quimérico divulgado puede incluirse en un vector de expresión (tal como un vector lentiviral) utilizado para transducir

una célula huésped, tal como una célula T, para producir el CAR divulgado. En algunas formas de realización, los procedimientos para utilizar el receptor antigénico quimérico incluyen aislar las células T de un sujeto, transducir las células T con un vector de expresión (como un vector lentiviral) que codifica el receptor antigénico quimérico y administrar las células T que expresan CAR al sujeto para un tratamiento, por ejemplo para el tratamiento de un tumor en el sujeto.

B. Anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno

Una forma de realización proporciona además un CAR utilizado en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas divulgadas en el presente documento, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo o dominio de unión a antígeno o parte del mismo, que se une específicamente a uno o más de los antígenos divulgados en el presente documento. Tal como se utiliza en el presente documento, una "célula T que expresa un CAR" o una "célula CAR-T" significa una célula T que expresa un CAR y tiene una especificidad antigénica determinada por, por ejemplo, el dominio de direccionamiento derivado del anticuerpo del CAR.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "dominio de unión a antígeno" puede incluir un anticuerpo y sus fragmentos de unión a antígeno. El término "anticuerpo" se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpos, que incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, siempre que muestren la actividad de unión al antígeno deseada. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos incluyen, por ejemplo, inmunoglobulinas intactas y variantes y fragmentos de las mismas que se sabe en la técnica que retienen la afinidad de unión por el antígeno.

Un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades secundarias. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un solo epítopo antigénico. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo especificando que se ha obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiera la producción del anticuerpo mediante ningún procedimiento en particular. En algunos ejemplos, un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo producido por un solo clon de linfocitos B o por una célula en la que se ha introducido el ácido nucleico que codifica las regiones variables ligera y pesada del anticuerpo de un solo anticuerpo (o un fragmento de unión a antígeno del mismo) transfectado, o una progenie del mismo. En algunos ejemplos, los anticuerpos monoclonales se aíslan de un sujeto. Los anticuerpos monoclonales pueden tener sustituciones de aminoácidos conservadoras que sustancialmente no tienen ningún efecto sobre la unión de antígenos u otras funciones de inmunoglobulina. Se conocen procedimientos ejemplares de producción de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, véase Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Publications, Nueva York (2013).

Por lo general, una inmunoglobulina tiene cadenas pesadas (H) y cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Los genes de inmunoglobulina incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como la miríada de genes de dominio variable de inmunoglobulina. Existen dos tipos de cadenas ligeras, lambda (λ) y kappa (κ). Existen cinco clases principales de cadenas pesadas (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante (o dominio constante) y una región variable (o dominio variable; véase, por ejemplo, Kindt et al. Kuby Immunology, 6ª ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007).) En varias formas de realización, las regiones variables de la cadena pesada y ligera se combinan para unirse específicamente al antígeno. En formas de realización adicionales, solo se requiere la región variable de la cadena pesada. Por ejemplo, los anticuerpos de camélidos de origen natural que constan únicamente de una cadena pesada son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera (véase, por ejemplo, Hamers-Casterman et al., Nature, 363: 446-448, 1993; Sheriff et al., Nat. Struct. Biol., 3: 733-736, 1996). Las referencias a "VH" o "VH" se refieren a la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo, incluida la de un fragmento de unión a antígeno, tal como Fv, scFv, dsFv o Fab. Las referencias a "VL" o "VL" se refieren al dominio variable de una cadena ligera de anticuerpo, incluido el de un Fv, scFv, dsFv o Fab.

Las regiones variables de cadena ligera y pesada contienen una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables, también llamadas "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR" (véase, por ejemplo, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos 1991). Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

Las CDR son principalmente responsables de unirse a un epítopo de un antígeno. Los límites de la secuencia de aminoácidos de una CDR determinada se pueden determinar fácilmente utilizando cualquiera de varios esquemas bien conocidos, incluidos los descritos por Kabat et al. ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed.

Public Health Service, National Institutes of Health (Instituto Nacional de Salud), Bethesda, MD, 1991; esquema de numeración "Kabat"), Al-Lazikani et al., (JMB 273,927-948, 1997; esquema de numeración "Chothia"), y Lefranc et al. ("IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains", Dev. Comp. Immunol., 27: 55-77, 2003; esquema de numeración "IMGT"). Las CDR de cada cadena se denominan generalmente CDR1, CDR2 y CDR3 (desde el extremo N al extremo C) y también se identifican generalmente por la cadena en la que se encuentra la CDR particular. Así, una VH CDR3 es la CDR3 del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una VL CDR1 es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra. Las CDR de cadena ligera a veces se denominan LCDR1, LCDR2 y LCDR3. Las CDR de cadena pesada a veces se denominan LCDR1, LCDR2 y LCDR3.

Un "fragmento de unión a antígeno" es una porción de un anticuerpo de longitud completa que conserva la capacidad de reconocer específicamente el antígeno afín, así como varias combinaciones de dichas porciones. Los ejemplos no limitantes de fragmentos de unión a antígeno incluyen Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos de unión a antígeno producidos por la modificación de anticuerpos completos o sintetizados *de novo* utilizando metodologías de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Kontermann y Dubel (Ed), Antibody Engineering, Vol. 1-2, 2ª Ed., Springer Press, 2010).

Un anticuerpo monocatenario (scFv) es una molécula modificada genéticamente que contiene los dominios VH y VL de uno o más anticuerpos enlazados mediante un enlazador polipeptídico adecuado tal como una molécula monocatenaria fusionada genéticamente (véase, por ejemplo, Bird et al., Science, 242: 423 426, 1988; Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 85: 5879 5883, 1988; Ahmad et al., Clin. Dev. Immunol., 2012, doi: 10.1155/2012 /980250; Marbry, IDrugs, 13: 543-549, 2010). La orientación intramolecular del dominio VH y el dominio VL en un scFv no es generalmente decisiva para los scFv. Por lo tanto, se pueden utilizar scFv con ambas disposiciones posibles (dominio VH-dominio enlazador-dominio VL; dominio VL-dominio enlazador-dominio VH).

En un dsFv, las cadenas variables de cadena pesada y ligera se han mutado para introducir un enlace disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. También se incluyen diacuerpos, que son anticuerpos bivalentes biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando así los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 90: 6444 6448, 1993; Poljak et al., Structure, 2: 1121 1123, 1994).

Los anticuerpos también incluyen formas modificadas genéticamente tales como anticuerpos quiméricos (tales como anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (tales como anticuerpos biespecíficos). Véase también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3ª ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

Los anticuerpos que no se producen de forma natural se pueden construir utilizando síntesis de péptidos en fase sólida, se pueden producir de forma recombinante o se pueden obtener, por ejemplo, mediante el cribado de bibliotecas combinatorias que consisten en cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables tal como se describe por Huse et al., Science 246: 1275-1281 (1989). Estos y otros procedimientos para preparar, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, injertados con CDR, monocatenarios y bifuncionales, son bien conocidos por los expertos en la técnica (Winter y Harris, Immunol. Today 14: 243-246 (1993); Ward et al., Nature 341: 544-546 (1989); Harlow y Lane, citado anteriormente, 1988; Hilyard et al., Protein Engineering: A practical approach (IRL Press 1992); Borrabeck, Antibody Engineering, 2ª ed. (Oxford University Press 1995).

Un "anticuerpo que se une al mismo epítopo" como anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competencia en un 50% o más y, a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competencia en un 50% o más. Se conocen ensayos de competencia de anticuerpos, y en el presente documento se proporciona un ensayo de competencia ejemplar.

Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno "humanizado" incluye una región marco humana y una o más CDR de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno no humano (tal como de ratón, de rata o sintético). El fragmento de unión a antígeno o anticuerpo no humano que proporciona las CDR se denomina "donante" y el fragmento de unión a antígeno o anticuerpo humano que proporciona el marco se denomina "aceptor". En una forma de realización, todas las CDR son de la inmunoglobulina del donante en una inmunoglobulina humanizada. No es necesario que estén presentes regiones constantes, pero si lo están, pueden ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de inmunoglobulina humana, tales como al menos aproximadamente el 85-90%, tal como aproximadamente el 95%, o más, idénticas. Por lo tanto, todas las partes de un anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de secuencias de anticuerpos humanos naturales.

Un "anticuerpo quimérico" es un anticuerpo que incluye secuencias derivadas de dos anticuerpos diferentes, que típicamente son de especies diferentes. En algunos ejemplos, un anticuerpo quimérico incluye una o más CDR y/o regiones marco de un anticuerpo humano y CDR y/o regiones marco de otro anticuerpo humano.

Un "anticuerpo completamente humano" o "anticuerpo humano" es un anticuerpo que incluye secuencias del genoma humano (o derivadas del mismo) y no incluye secuencias de otra especie. En algunas formas de realización, un anticuerpo humano incluye CDR, regiones marco y (si está presente) una región Fc del genoma humano (o derivada del mismo). Los anticuerpos humanos se pueden identificar y aislar utilizando tecnologías para crear anticuerpos basados en secuencias derivadas del genoma humano, por ejemplo, mediante presentación de fagos o usando animales transgénicos (véase, por ejemplo, Barbas et al. Phage display: A Laboratory Manuel. 1ª Ed. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004. Print.; Lonberg, Nat. Biotech., 23: 1117-1125, 2005; Lonenberg, Curr. Opin. Immunol., 20: 450-459, 2008).

Un anticuerpo puede tener uno o más sitios de unión. Si hay más de un sitio de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes. Por ejemplo, una inmunoglobulina de origen natural tiene dos sitios de unión idénticos, un anticuerpo monocatenario o un fragmento Fab tiene un sitio de unión, mientras que un anticuerpo biespecífico o bifuncional tiene dos sitios de unión diferentes.

Los procedimientos de análisis de anticuerpos para determinar su capacidad de unión a cualquier parte funcional del CAR son conocidos en la técnica e incluyen cualquier ensayo de unión de anticuerpo-antígeno, tal como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ELISA, inmunotransferencia Western, inmunoprecipitación y ensayos de inhibición competitivos (véase, por ejemplo, Janeway et al., citado más adelante, publicación de solicitud de patente de Estados Unidos Nº 2002/0197266 A1 y patente de Estados Unidos Nº 7.338.929).

Además, un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, puede comprender un marcador detectable, tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante) y partículas de elementos (por ejemplo, partículas de oro).

C. Conjugados

Los CAR utilizados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas divulgadas en el presente documento, una célula T que expresa un CAR, o anticuerpos monoclonales, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, específicos para uno o más de los antígenos divulgados en el presente documento, puede conjugarse con un agente, tal como una molécula efectora o un marcador detectable, utilizando cualquier número de medios conocidos por los expertos en la técnica. Pueden utilizarse medios de unión tanto covalentes como no covalentes. Los conjugados incluyen, pero sin limitación, moléculas en las que existe un enlace covalente de una molécula efectora o un marcador detectable a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a uno o más de los antígenos divulgados en el presente documento. Un experto en la técnica apreciará que se pueden utilizar varias moléculas efectoras y marcadores detectables, que incluyen (pero sin limitación) agentes quimioterapéuticos, agentes anti-angiogénicos, toxinas, agentes radiactivos tales como ^{125}I, ^{32}P, ^{14}C, ^{3}H y ^{35}S y otros marcadores, restos diana y ligandos, etc.

La elección de una molécula efectora particular o un marcador detectable depende de la molécula o célula diana particular y del efecto biológico deseado. Así, por ejemplo, la molécula efectora puede ser una citotoxina que se utiliza para provocar la muerte de una célula diana particular (tal como una célula tumoral).

El procedimiento para unir una molécula efectora o un marcador detectable a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno varía según la estructura química del efector. Los polipéptidos contienen generalmente una diversidad de grupos funcionales; tales como grupos de ácido carboxílico (COOH), de amina libre ($-NH_2$) o sulfhidrilo (-SH), que están disponibles para la reacción con un grupo funcional adecuado de un anticuerpo para dar como resultado la unión de la molécula efectora o marcador detectable. Como alternativa, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno se derivatiza para exponer o unir grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de varias moléculas enlazadoras conocidas tales como las disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford, IL. El enlazador puede ser cualquier molécula utilizada para unir el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno a la molécula efectora o marcador detectable. El enlazador es capaz de formar enlaces covalentes tanto con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como con la molécula efectora o marcador detectable. Los enlazadores adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, enlazadores de carbono de cadena lineal o ramificada, enlazadores de carbono heterocíclicos o enlazadores peptídicos. Cuando el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno y la molécula efectora o el marcador detectable son polipéptidos, los enlazadores pueden unirse a los aminoácidos constituyentes a través de sus grupos laterales (por ejemplo, a través de un enlace disulfuro a cisteína) o a los grupos amino y carboxilo de carbono alfa de los aminoácidos terminales.

En varias formas de realización, el enlazador puede incluir un elemento espaciador que, cuando está presente, aumenta el tamaño del enlazador, de forma que aumenta la distancia entre la molécula efectora o el marcador detectable y el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Los espaciadores ejemplares son conocidos por el experto

en la técnica, e incluyen los enumerados en las patentes de Estados Unidos Nº 7.498.298, 6.884.869, 6.323.315, 6.239.104, 6.034.065, 5.780.588, 5.665.860, 5.663.149, 5.635.483, 5.599.902, 5.554.725, 5.530.097, 5.521.284, 5.504.191, 5.410.024, 5.138.036, 5.076.973, 4.986.988, 4.978.744, 4.879.278, 4.816.444 y 4.486.414, así como en las publicaciones de patente de Estados Unidos Nº 20110212088 y 20110070248.

En algunas formas de realización, el enlazador se puede escindir en condiciones intracelulares, de tal forma que la escisión del enlazador libera la molécula efectora o marcador detectable del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en el entorno intracelular. En otras formas de realización más, el enlazador no se puede escindir y la molécula efectora o marcador detectable se libera, por ejemplo, por degradación del anticuerpo. En algunas formas de realización, el enlazador se puede escindir mediante un agente de escisión que está presente en el entorno intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El enlazador puede ser, por ejemplo, un enlazador peptídico que se escinde por una enzima proteasa o peptidasa intracelular, que incluye, pero sin limitación, una proteasa liposómica o endosómica. En algunas formas de realización, el enlazador peptídico tiene al menos dos aminoácidos de largo o al menos tres aminoácidos de largo. Sin embargo, el enlazador puede tener 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos de longitud, tal como 1-2, 1-3, 2-5, 3-10, 3-15, 1-5, 1-10, 1-15 aminoácidos de longitud. Las proteasas pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, todas las cuales son conocidas por hidrolizar derivados de fármacos dipéptidos dando como resultado la liberación de fármaco activo dentro de las células diana (véase, por ejemplo, Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83: 67-123). Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador peptídico que se puede escindir mediante la proteasa catepsina-B dependiente de tiol (por ejemplo, un enlazador de fenilalanina-leucina o glicina-fenilalanina-leucina-glicina). Otros ejemplos de dichos enlazadores se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos Nº 6.214.345. En una forma de realización específica, el enlazador peptídico escindible por una proteasa intracelular es un enlazador de valina-citrulina o un enlazador de fenilalanina-lisina (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 6.214.345, que describe la síntesis de doxorrubicina con el enlazador de valina-citrulina).

En otras formas de realización, el enlazador escindible es sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a determinados valores de pH. Normalmente, el enlazador sensible al pH es hidrolizable en condiciones ácidas. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil a los ácidos que sea hidrolizable en el lisosoma (por ejemplo, una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-aconítica, ortoéster, acetal, cetal o similares). (Véanse, por ejemplo, las patente de Estados Unidos Nº 5.122.368, 5.824.805, 5.622.929; Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Terapéutica 83: 67-123; Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264: 14653-14661). Dichos enlazadores son relativamente estables en condiciones de pH neutro, como las de la sangre, pero son inestables a un pH inferior a 5,5 o 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En determinadas formas de realización, el enlazador hidrolizable es un enlazador de tioéter (tal como, por ejemplo, un tioéter unido al agente terapéutico mediante un enlace acilhidrazona (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 5.622.929).

En otras formas de realización, el enlazador se puede escindir en condiciones reductoras (por ejemplo, un enlazador disulfuro). Se conocen en la técnica una diversidad de enlazadores disulfuro, incluidos, por ejemplo, los que se pueden formar utilizando SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato), SPDP (propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio)), SPDB (butirato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio)) y SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-alfametil-alfa-(2-piridil-ditio)tolueno)-, SPDB y SMPT. (Véase, por ejemplo, Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47: 5924-5931; Wawrzynczak et al., en Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987); Phillips et al., Cancer Res. 68: 92809290, 2008). Véase también la patente de Estados Unidos Nº 4.880.935.)

En otras formas de realización específicas más, el enlazador es un enlazador de malonato (Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 15: 1387-93), un enlazador de maleimidobenzoílo (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3 (10): 1299-1304), o un análogo de 3'-N-amida (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3 (10): 1305-12).

En otras formas de realización más, el enlazador no se puede escindir y la molécula efectora o marcador detectable se libera por degradación del anticuerpo. (Véase la publicación de patente de Estados Unidos Nº 2005/0238649.

En varias formas de realización, el enlazador es resistente a la escisión en un entorno extracelular. Por ejemplo, no más de aproximadamente el 20%, no más de aproximadamente el 15%, no más de aproximadamente el 10%, no más de aproximadamente el 5%, no más de aproximadamente el 3% o no más de aproximadamente el 1% de los enlazadores, en una muestra de conjugado, se escinden cuando el conjugado está presente en un entorno extracelular (por ejemplo, en plasma). Se puede determinar si un enlazador es o no resistente a la escisión en un entorno extracelular, por ejemplo, incubando el conjugado que contiene el enlazador de interés con plasma durante un periodo de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 8, 16 o 24 horas) y después cuantificando la cantidad de molécula efectora o marcador detectable libre presente en el plasma. Una diversidad de enlazadores ejemplares que se pueden utilizar en conjugados se describen en el documento WO 2004-010957, la publicación de Estados Unidos Nº 2006/0074008, la publicación de Estados Unidos Nº 20050238649 y la publicación de Estados Unidos Nº 2006/0024317.

En varias formas de realización, se proporcionan conjugados de un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como una

caliqueamicina, maitansinoides, dolastatinas, auristatinas, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

Los compuestos de maitansina adecuados para su uso como restos de toxina maitansinoide son bien conocidos en la técnica y pueden aislarse a partir de fuentes naturales siguiendo procedimientos conocidos, producidos utilizando técnicas de ingeniería genética (véase Yu et al. (2002) PNAS 99: 7968-7973), o maitansinol y análogos de maitansinol preparados sintéticamente según procedimientos conocidos. Los maitansinoides son inhibidores mitotóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto de África oriental Maytenus serrata (patente de Estados Unidos Nº 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente de Estados Unidos Nº 4.151.042). El maitansinol sintético y sus derivados y análogos se divulgan, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nº 4.137.230, 4.248.870, 4.256.746, 4.260.608, 4.265.814, 4.294.757, 4.307.016, 4.308.268, 4.308.269, 4.309.428, 4.313.946, 4.315.929, 4.317.821,4.322.348, 4.331.598, 4.361.650, 4.364.866, 4.424.219, 4.450.254, 4.362.663 y 4.371.533. Los conjugados que contienen maitansinoides, los procedimientos para prepararlos y su uso terapéutico se divulgan, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nº 5.208.020, 5.416.064, 6.441.163 y la patente europea EP 0 425 235 B1.

Pueden emplearse toxinas adicionales con un CAR, una célula T que exprese un CAR, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de toxinas incluyen exotoxina de pseudomonas (PE), ricina, abrina, toxina diftérica y subunidades de la misma, ribotoxina, ribonucleasa, saporina y caliqueamicina, así como toxinas botulínicas A a F. Estas toxinas son bien conocidas en la técnica y muchas están fácilmente disponibles de fuentes comerciales (por ejemplo, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Las toxinas contempladas también incluyen variantes de las toxinas (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nº 5.079.163 y 4.689.401).

La saporina es una toxina derivada de Saponaria officinalis que interrumpe la síntesis de proteínas mediante inactivación de la porción 60S del complejo ribosómico (Stirpe et al., Bio/Technology, 10: 405-412, 1992). Sin embargo, la toxina no tiene un mecanismo para la entrada específica en las células y, por lo tanto, requiere su conjugación con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconozca una proteína de la superficie celular que se internaliza para que las células la absorban de forma eficaz.

La toxina diftérica se aísla de Corynebacterium diphtheriae. Normalmente, la toxina diftérica para su uso en inmunotoxinas se muta para reducir o eliminar la toxicidad no específica. Un mutante conocido como CRM107, que tiene una actividad enzimática completa pero una toxicidad inespecífica notablemente reducida, se conoce desde la década de 1970 (Laird y Groman, J. Virol. 19: 220, 1976), y se ha utilizado en ensayos clínicos en seres humanos. Veánse la patente de Estados Unidos Nº 5.792.458 y la patente de Estados Unidos Nº 5.208.021.

La ricina es la lectina RCA60 de Ricinus communis (ricino). Para ver ejemplos de ricina, véase la patente de Estados Unidos Nº 5.079.163 y la patente de Estados Unidos Nº 4.689.401. La aglutinina de Ricinus communis (RCA) se presenta en dos formas denominadas RCA_{60} y RCA_{120} según sus pesos moleculares de aproximadamente 65 y 120 kD, respectivamente (Nicholson y Blaustein, J. Biochim. Biophys. Acta 266: 543, 1972). La cadena A es responsable de inactivar la síntesis de proteínas y destruir las células. La cadena B une la ricina a los residuos de galactosa de la superficie celular y facilita el transporte de la cadena A al citosol (Olsnes et al., Nature 249: 627-631, 1974 y patente de Estados Unidos Nº 3.060.165).

Las ribonucleasas también se han conjugado con moléculas de direccionamiento para su uso como inmunotoxinas (véase Suzuki et al., Nat. Biotecnología. 17: 265-70, 1999). Ribotoxinas ejemplares tales como α-sarcina y restrictocina se explican, por ejemplo, en Rathore et al., Gene 190: 31-5, 1997; y Goyal y Batra, Biochem. 345 Pt 2: 247-54, 2000. Las caliqueamicinas se aislaron por primera vez de Micromonospora echinospora y son miembros de la familia de antibióticos antitumorales de enediinas que causan roturas bicatenarias en el ADN que conducen a la apoptosis (véase, por ejemplo, Lee et al., J. Antibiot. 42: 1070-87,1989). El fármaco es la fracción tóxica de una inmunotoxina en ensayos clínicos (véase, por ejemplo, Gillespie et al., Ann. Oncol. 11: 735-41, 2000).

La abrina incluye lectinas tóxicas de Abrus precatorius. Los principios tóxicos, abrina a, b, c y d, tienen un peso molecular de aproximadamente 63 y 67 kD y están compuestos por dos cadenas polipeptídicas A y B unidas por disulfuro. La cadena A inhibe la síntesis de proteínas; la cadena B (abrina-b) se une a los residuos de D-galactosa (véase, Funatsu et al., Agr. Biol. Chem. 52: 1095, 1988; y Olsnes, Methods Enzymol. 50: 330-335, 1978).

El CAR utilizado en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, una célula T que expresa un CAR, anticuerpos monoclonales, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, específicos para uno o más de los antígenos divulgados en el presente documento, también puede conjugarse con un marcador detectable; por ejemplo, un marcador detectable que puede detectarse mediante ELISA, espectrofotometría, citometría de flujo, microscopía o técnicas de diagnóstico por imágenes (tales como tomografía computarizada (TC), tomografía axial computarizada (CAT), obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI), obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear NMRI), tomografía por resonancia magnética (MTR), ecografía, examen de fibra óptica y examen laparoscópico). Ejemplos específicos no limitantes de marcadores detectables incluyen fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, enlaces enzimáticos, isótopos radiactivos y metales o compuestos pesados (por ejemplo,

nanocristales de óxido de hierro superparamagnéticos para detección por MRI). Por ejemplo, los marcadores detectables útiles incluyen compuestos fluorescentes, que incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina, fósforos de lantánidos y similares. También se utilizan marcadores bioluminiscentes, tales como luciferasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente amarilla (YFP). Un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, también se puede conjugar con enzimas que son útiles para la detección, tales como peroxidasa de rábano picante, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares. Cuando un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, se conjuga con una enzima detectable, se puede detectar añadiendo reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción que se puede discernir. Por ejemplo, cuando está presente el agente peroxidasa de rábano picante, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es visualmente detectable. Un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, también puede conjugarse con biotina y detectarse mediante medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina. Debe indicarse que la propia avidina puede conjugarse con una enzima o un marcador fluorescente.

Un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, puede conjugarse con un agente paramagnético, tal como gadolinio. Agentes paramagnéticos tales como el óxido de hierro superparamagnético también se utilizan como marcadores. Los anticuerpos también se pueden conjugar con lantánidos (tales como europio y disprosio) y manganeso. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno también puede marcarse con epítopos de polipéptido predeterminados reconocidos por un informador secundario (tales como secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopo).

Un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, también se puede conjugar con un aminoácido radiomarcado. El radiomarcador se puede utilizar tanto con fines diagnósticos como terapéuticos. Por ejemplo, el radiomarcador se puede utilizar para detectar uno o más de los antígenos divulgados en el presente documento y células que expresan antígenos mediante rayos X, espectros de emisión u otras técnicas de diagnóstico. Además, el radiomarcador puede utillizarse terapéuticamente como una toxina para el tratamiento de tumores en un sujeto, por ejemplo, para el tratamiento de un neuroblastoma. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero sin limitación, los siguientes radioisótopos o radionucleótidos: ^{3}H ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I.

Los expertos en la técnica conocen bien los medios para detectar dichos marcadores detectables. Así, por ejemplo, los radiomarcadores pueden detectarse utilizando una película fotográfica o contadores de centelleo, los marcadores fluorescentes pueden detectarse utilizando un fotodetector para detectar la iluminación emitida. Las marcas enzimáticas se detectan típicamente proporcionando a la enzima un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y las marcas colorimétricas se detectan simplemente visualizando la marca coloreada.

D. Nucleótidos, expresión, vectores y células huésped

Además, una forma de realización de la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los CAR, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, descritos en el presente documento (incluidas las porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos). Los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las secuencias líder, dominios de unión a antígeno, dominios transmembrana y/o dominios de señalización de células T intracelulares descritos en el presente documento.

En una forma de realización, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un receptor antigénico quimérico (CAR) que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, al menos un dominio de unión a antígeno extracelular, al menos un dominio transmembrana y al menos un dominio de señalización intracelular.

En una forma de realización del CAR utilizado en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el dominio de unión a antígeno extracelular codificado comprende al menos un fragmento variable monocatenario de un anticuerpo que se une al antígeno.

En otra forma de realización del CAR utilizado en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el dominio de unión a antígeno extracelular codificado comprende al menos una región variable de cadena pesada de un anticuerpo que se une al antígeno.

En otra forma de realización más del CAR utilizado en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el dominio de unión a antígeno extracelular del CAR codificado comprende al menos un antígeno de unión a antígeno basado en lipocalina (anticalinas) que se une al antígeno.

En una forma de realización del CAR utilizado en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada en la que el dominio de unión a antígeno extracelular codificado está conectado al dominio transmembrana mediante un dominio enlazador.

En otra forma de realización de las CAR utilizadas en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la CAR en la que el dominio de unión a antígeno extracelular codificado está precedido por una secuencia que codifica un péptido líder o señal.

En otra forma de realización más de los CAR utilizados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el dominio de unión a antígeno extracelular codificado se dirige a un antígeno que incluye, pero sin limitación, CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33/IL3Ra, CD38, CD123 (IL3RA), CD138, BCMA (CD269), GPC2, GPC3, FGFR4, c-Met, PSMA, glicolípido F77, EGFRvIII , GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR o cualquier combinación de los mismos.

En determinadas formas de realización de los CAR utilizados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el dominio de unión a antígeno extracelular codificado comprende un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD19, un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD20, un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD22, un dominio de unión a antígeno scFV anti-ROR1, un dominio de unión a antígeno scFV anti-TSLPR, un dominio de unión a antígeno scFV anti-mesotelina, un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD33, IL3Ra un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD38, un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD123 (IL3RA), un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD138, un dominio de unión a antígeno scFV anti-BCMA (CD269), un dominio de unión a antígeno scFV anti-GPC2, un dominio de unión a antígeno scFV anti-GPC3, un dominio de unión a antígeno scFV anti-FGFR4, un dominio de unión a antígeno scFV anti-c-Met, un dominio de unión a antígeno scFV anti-PSMA, un dominio de unión a antígeno scFV anti-glicolípido F77, un dominio de unión a antígeno scFV anti-EGFRvIII, un dominio de unión a antígeno scFV anti-GD-2, un dominio de unión a antígeno scFV anti-NY-ESo-1 TCR, un dominio de unión a antígeno scFV anti-MAGE A3 TCR, o una secuencia de aminoácidos con el 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.

En un aspecto de las CAR utilizadas en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, las CAR proporcionadas en el presente documento comprenden además un dominio enlazador.

En una forma de realización de los CAR utilizados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el dominio de unión a antígeno extracelular, el dominio de señalización intracelular o ambos están conectado al dominio transmembrana por un dominio enlazador.

En una forma de realización de los CAR utilizados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el dominio enlazador codificado se deriva del dominio extracelular de CD8, y está enlazado al dominio transmembrana.

En otra forma de realización más de los CAR utilizados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana comprende una secuencia de nucleótidos con el 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de la misma.

En una forma de realización de los CAR utililzados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el dominio transmembrana codificado comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una pero no más de 10 modificaciones, o una secuencia con el 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con respecto a la misma.

En otra forma de realización de los CAR utilizados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el CAR codificado comprende además un dominio transmembrana que comprende un dominio transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154, o una combinación de los mismos.

En otra forma de realización más de los CAR utilizados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el dominio de señalización intracelular codificado comprende además un dominio intracelular CD3 zeta.

En una forma de realización del CAR divulgado en el presente documento, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el dominio de señalización intracelular codificado está dispuesto en un lado C-terminal con respecto al dominio intracelular CD3 zeta.

En otra forma de realización de los CAR utilizados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el, al menos un, dominio de señalización intracelular codificado comprende un dominio coestimulador, un dominio de señalización primario, o una combinación de los mismos.

En otras formas de realización de los CAR utilizados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el, al menos un, dominio coestimulador codificado comprende un dominio de señalización funcional de OX40, CD70, CD27, CD28, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), DAP10, DAP12 y 4-1BB (CD137), o una combinación de los mismos.

En una forma de realización de los CAR utilizados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR que contiene además una secuencia líder o secuencia de péptido señal.

En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos puede tener codones modificados. Sin vincularse a ninguna teoría particular, se cree que la optimización de codones de la secuencia de nucleótidos aumenta la eficacia de traducción de los transcritos de ARNm. La optimización del codón de la secuencia de nucleótidos puede implicar la sustitución de un codón nativo por otro codón que codifica el mismo aminoácido, pero puede ser traducido por ARNt que está más fácilmente disponible dentro de una célula, aumentando así la eficacia de la traducción. La optimización de la secuencia de nucleótidos también puede reducir las estructuras de ARNm secundarias que interferirían con la traducción, aumentando así la eficacia de la traducción.

En una forma de realización de la invención, el ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos con codones modificados que codifica el dominio de unión a antígeno del CAR de la invención. En otra forma de realización de la invención, el ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos con codones modificados que codifica cualquiera de los CAR descritos en el presente documento (incluidas porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos).

"Ácido nucleico", tal como se utiliza en el presente documento, incluye "polinucleótido", "oligonucleótido" y "molécula de ácido nucleico", y generalmente significa un polímero de ADN o ARN, que puede ser monocatenario o bicatenario, sintetizado u obtenido (por ejemplo, aislado y/o purificado) a partir de fuentes naturales, que puede contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, y que puede contener un enlace internucleotídico natural, no natural o alterado, tal como un enlace fosforamidato o un enlace fosforotioato, en lugar del fosfodiéster encontrado entre los nucleótidos de un oligonucleótido no modificado. En algunas formas de realización, el ácido nucleico no comprende inserciones, deleciones, inversiones y/o sustituciones. Sin embargo, puede ser adecuado en algunos casos, tal como se explica en el presente documento, que el ácido nucleico comprenda una o más inserciones, deleciones, inversiones y/o sustituciones.

Un ácido nucleico recombinante puede ser uno que tiene una secuencia que no tiene origen natural o que tiene una secuencia que se produce mediante una combinación artificial de dos segmentos de secuencia de otro modo separados. Esta combinación artificial a menudo se logra mediante síntesis química o, más comúnmente, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética, tales como las descritas en Sambrook et al., citado anteriormente. Los ácidos nucleicos se pueden construir basándose en síntesis química y/o reacciones de ligación enzimática utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., citado anteriormente, y Ausubel et al., citado anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico se puede sintetizar químicamente utilizando nucleótidos de origen natural o nucleótidos modificados de diversas formas diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado tras la hibridación (por ejemplo, derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina). Los ejemplos de nucleótidos modificados que se pueden utilizar para generar los ácidos nucleicos incluyen, pero sin limitación, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, adenina N6-sustituida, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico de ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, uno o más de los ácidos nucleicos de la invención se pueden adquirir de empresas tales como Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, Estados Unidos).

El ácido nucleico puede comprender cualquier secuencia de nucleótidos aislada o purificada que codifique cualquiera de los CAR o porciones funcionales o variantes funcionales de los mismos. Alternativamente, la secuencia de

nucleótidos puede comprender una secuencia de nucleótidos que está degenerada en cualquiera de las secuencias o una combinación de secuencias degeneradas.

Una forma de realización también proporciona un ácido nucleico aislado o purificado que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento o una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento.

La secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas puede hibridarse en condiciones de alta rigurosidad. Por "condiciones de alta rigurosidad" se entiende que la secuencia de nucleótidos se hibrida específicamente con una secuencia diana (la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento) en una cantidad que puede detectarse de forma más intensa que la hibridación no específica. Las condiciones de alta rigurosidad incluyen condiciones que distinguirían un polinucleótido con una secuencia complementaria exacta, o uno que contenga solo unos pocos desajustes dispersos, de una secuencia aleatoria que tuviera unas pocas regiones pequeñas (por ejemplo, 3-10 bases) que coincidieran con la secuencia de nucleótidos. Estas regiones de complementariedad pequeñas se funden más fácilmente que un complemento de longitud completa de 14-17 o más bases, y la hibridación de alta rigurosidad las hace fácilmente distinguibles. Las condiciones de rigurosidad relativamente alta incluirían, por ejemplo, condiciones de baja salinidad y/o alta temperatura, tales como las proporcionadas por NaCl aproximadamente 0,02-0,1 M o el equivalente, a temperaturas de aproximadamente 50-70 ºC. Dichas condiciones de alta rigurosidad toleran poco desajuste entre la secuencia de nucleótidos y la plantilla o la hebra diana, si es que toleran alguno, y son particularmente adecuadas para detectar la expresión de cualquiera de los CAR de la invención. Se aprecia generalmente que las condiciones se pueden hacer más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida.

También se proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente el 70% o más, por ejemplo, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98% o aproximadamente el 99% idéntica a cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento.

En una forma de realización, los ácidos nucleicos pueden incorporarse a un vector de expresión recombinante. A este respecto, una forma de realización proporciona vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos. Para los fines del presente documento, el término "vector de expresión recombinante" significa un constructo de oligonucleótidos o polinucleótidos modificado genéticamente que permite la expresión de un ARNm, proteína, polipéptido o péptido por una célula huésped, cuando el constructo comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el ARNm, proteína, polipéptido o péptido, y el vector se pone en contacto con la célula en condiciones suficientes para que el ARNm, proteína, polipéptido o péptido se exprese dentro de la célula. Los vectores, en general, no son de origen natural.

No obstante, partes de los vectores pueden ser de origen natural. Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender cualquier tipo de nucleótidos, incluidos, pero sin limitación, ADN y ARN, que pueden ser monocatenarios o bicatenarios, sintetizados u obtenidos en parte de fuentes naturales, y que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados. Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender enlaces internucleotídicos de origen natural o no natural, o ambos tipos de enlaces. Preferentemente, los nucleótidos o enlaces internucleotídicos alterados o no naturales no obstaculizan la transcripción o la replicación del vector.

En una forma de realización, el vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado y puede utilizarse para transformar o transfectar cualquier célula huésped adecuada. Los vectores adecuados incluyen aquellos diseñados para propagación y expansión o para expresión o para ambos, tales como plásmidos y virus. El vector se puede seleccionar del grupo que consiste en la serie pUC (Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, MD), la serie pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA), la serie pET (Novagen, Madison, WI), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y la serie pEX (Clontech, Palo Alto, CA).

También se pueden utilizar vectores bacteriófagos, tales como λűTIO, λűTI l, λZapII (Stratagene), EMBL4 y λNMI 149. Los ejemplos de vectores de expresión vegetales incluyen pBIOl, pBI101.2, pBHOl.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). Los ejemplos de vectores de expresión animales incluyen pEUK-Cl, pMAM y pMAMneo (Clontech). El vector de expresión recombinante puede ser un vector vírico, por ejemplo, un vector retroviral o un vector lentiviral. Un vector lentiviral es un vector derivado de al menos una porción de un genoma de lentivirus, que incluye especialmente un vector lentiviral autoactivante tal como se proporciona por Milone et al., Mol. El r. 17 (8): 1453-1464 (2009)). Otros ejemplos de vectores lentivirus que pueden utilizarse en la clínica incluyen, por ejemplo, y no a modo de limitación, la tecnología de entrega de genes LENTIVECTOR.RTM. de Oxford BioMedica plc, el sistema de vectores de Lentigen LENTIMAX.TM. y similares. También están disponibles tipos no clínicos de vectores lentivirales, que serán conocidos por los expertos en la técnica.

Se conocen generalmente en la técnica varias técnicas de transfección (véase, por ejemplo, Graham et al., Virology, 52: 456-467 (1973); Sambrook et al., citado anteriormente; Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier (1986); y Chu et al., Gene, 13: 97 (1981).

Los procedimientos de transfección incluyen la coprecipitación con fosfato de calcio (véase, por ejemplo, Graham et al., citado anteriormente), microinyección directa en células cultivadas (véase, por ejemplo, Capecchi, Cell, 22: 479-488 (1980)), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa et al., BioTechniques, 6: 742-751 (1988)), transferencia de genes mediada por liposomas (véase, por ejemplo, Mannino et al., BioTechniques, 6: 682-690 (1988)), transducción mediada por lípidos (véase, por ejemplo, Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7413-7417 (1987)), y entrega de ácido nucleico utilizando microproyectiles de alta velocidad (véase, por ejemplo, Klein et al., Nature, 327: 70-73 (1987)).

En una forma de realización, los vectores de expresión recombinantes pueden prepararse utilizando técnicas estándar de ADN recombinante descritas por, por ejemplo, Sambrook et al., citado anteriormente, y Ausubel et al., citado anteriormente. Los constructos de vectores de expresión, que son circulares o lineales, pueden prepararse para que contengan un sistema de replicación funcional en una célula huésped procariota o eucariota. Los sistemas de replicación pueden derivarse, por ejemplo, de ColEl, plásmido 2 μ, λ, SV40, virus del papiloma bovino y similares.

El vector de expresión recombinante puede comprender secuencias reguladoras, tales como codones de iniciación y terminación de la transcripción y la traducción, que son específicas del tipo de célula huésped (por ejemplo, bacteria, hongo, planta o animal) en la que se introducirá el vector, según sea apropiado, y teniendo en cuenta si el vector está basado en ADN o en ARN. El vector de expresión recombinante puede comprender sitios de restricción para facilitar la clonación.

El vector de expresión recombinante puede incluir uno o más genes marcadores, que permiten la selección de células huésped transformadas o transfectadas. Los genes marcadores incluyen resistencia a biocidas, por ejemplo, resistencia a antibióticos, metales pesados, etc., complementación en un huésped auxotrófico para proporcionar prototrofia, y similares. Los genes marcadores adecuados para los vectores de expresión de la invención incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a neomicina/G418, genes de resistencia a higromicina, genes de resistencia a histidinol, genes de resistencia a tetraciclina y genes de resistencia a ampicilina.

El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor nativo o no nativo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el CAR (incluidas las porciones funcionales y variantes funcionales del mismo), o a la secuencia de nucleótidos que es complementaria o que se hibrida con la secuencia de nucleótidos que codifica el CAR. La selección de promotores, por ejemplo, fuertes, débiles, inducibles, específicos de tejido y específicos del desarrollo, se encuentra en el conocimiento ordinario del experto. De forma similar, la combinación de una secuencia de nucleótidos con un promotor también está dentro del conocimiento del experto. El promotor puede ser un promotor no vírico o un promotor vírico, por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de SV40, un promotor de RSV o un promotor que se encuentra en la repetición terminal larga del virus de células madre murinas.

Los vectores de expresión recombinantes pueden diseñarse para la expresión transitoria, para la expresión estable o para ambas. Además, los vectores de expresión recombinantes pueden prepararse para la expresión constitutiva o para la expresión inducible.

Además, se puede hacer que los vectores de expresión recombinantes incluyan un gen suicida. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "gen suicida" se refiere a un gen que hace que muera la célula que expresa el gen suicida. El gen suicida puede ser un gen que confiere sensibilidad a un agente, por ejemplo, un fármaco, a la célula en la que se expresa el gen, y hace que la célula muera cuando la célula entra en contacto con el agente o se expone al mismo. Los genes suicidas son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, Reino Unido), Humana Press, 2004) e incluyen, por ejemplo, el gen de timidina quinasa (TK) del virus del herpes simple (HSV), citosina daminasa, purina nucleósido fosforilasa y nitrorreductasa.

Una forma de realización además proporciona una célula huésped que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos en el presente documento. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "célula huésped" se refiere a cualquier tipo de célula que pueda contener el vector de expresión recombinante de la invención. La célula huésped puede ser una célula eucariota, por ejemplo, vegetal, animal, fúngica o de alga, o puede ser una célula procariota, por ejemplo, de bacterias o protozoos. La célula huésped puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente de un organismo, por ejemplo, un ser humano. La célula huésped puede ser una célula adherente o una célula suspendida, es decir, una célula que crece en suspensión. Las células huésped adecuadas son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, células DH5a de E. coli, células de ovario de hámster chino, células VERO de mono, células COS, células HEK293 y similares. Con el fin de amplificar o replicar el vector de expresión recombinante, la célula huésped puede ser una célula procariota, por ejemplo, una célula DH5a. Con el fin de producir un CAR recombinante, la célula huésped puede ser una célula de mamífero. La célula huésped puede ser una célula humana. Si bien la célula huésped puede ser de cualquier tipo de célula, puede originarse a partir de cualquier tipo de tejido y puede estar en cualquier etapa de desarrollo, la célula huésped puede ser un linfocito

de sangre periférica (PBL) o una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC). La célula huésped puede ser una célula T.

Para los fines de la presente invención, la célula T puede ser cualquier célula T, tal como una célula T cultivada, por ejemplo, una célula T primaria, o una célula T de una línea de células T cultivada, por ejemplo, Jurkat, SupTl, etc., o una célula T célula obtenida de un mamífero. Si se obtiene de un mamífero, la célula T se puede obtener de numerosas fuentes, que incluyen, pero sin limitación, sangre, médula ósea, ganglios linfáticos, timo u otros tejidos o fluidos. Las células T también se pueden enriquecer o purificar. La célula T puede ser una célula T humana. La célula T puede ser una célula T aislada de un ser humano. La célula T puede ser cualquier tipo de célula T y puede estar en cualquier etapa de desarrollo, incluidas, pero sin limitación, células T doble positivas CD4+/CD8+, células T cooperadoras CD4+, por ejemplo, células Thi y Th2, células T CD8+ (por ejemplo, células T citotóxicas), células infiltrantes de tumores, células T de memoria, células T vírgenes y similares. La célula T puede ser una célula T CD8+ o una célula T CD4+.

En una forma de realización, los CAR, tal como se describen en el presente documento, pueden utilizarse en células que no son células T adecuadas. Estas células son aquellas que tienen una función efectora inmunitaria, tales como, por ejemplo, células NK y células similares a células T generadas a partir de células madre pluripotentes.

También se proporciona mediante una forma de realización una población de células que comprende al menos una célula huésped descrita en el presente documento. La población de células puede ser una población heterogénea que comprende la célula huésped que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos, además de al menos otra célula, por ejemplo una célula huésped (por ejemplo, una célula T), que no comprende ninguno de los vectores de expresión recombinantes, o una célula distinta a la célula T, por ejemplo, una célula B, un macrófago, un neutrófilo, un eritrocito, un hepatocito, una célula endotelial, una célula epitelial, una célula muscular, una célula cerebral, etc. Alternativamente, la población de células puede ser una población sustancialmente homogénea, en la que la población comprende principalmente (por ejemplo, consiste esencialmente en) células huésped que comprenden el vector de expresión recombinante. La población también puede ser una población clónica de células, en la que todas las células de la población son clones de una única célula huésped que comprende un vector de expresión recombinante, de tal forma que todas las células de la población comprenden el vector de expresión recombinante. En una forma de realización de la invención, la población de células es una población clónica que comprende células huésped que comprenden un vector de expresión recombinante tal como se describe en el presente documento.

Los CAR (incluidas las porciones funcionales y variantes de los mismos), los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células huésped (incluidas las poblaciones de las mismas) y los anticuerpos (incluidas las porciones de unión a antígeno de los mismos) pueden aislarse y/o purificarse. Por ejemplo, una preparación de célula huésped purificada (o aislada) es aquella en la que la célula huésped es más pura que las células en su entorno natural dentro del cuerpo. Dichas células huésped se pueden producir, por ejemplo, mediante técnicas de purificación estándar. En algunas formas de realización, una preparación de una célula huésped se purifica de forma que la célula huésped represente al menos aproximadamente el 50%, por ejemplo, al menos aproximadamente el 70%, del contenido celular total de la preparación. Por ejemplo, la pureza puede ser de al menos aproximadamente el 50%, puede ser superior a aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70% o aproximadamente el 80%, o puede ser de aproximadamente el 100%.

E. Procedimientos de tratamiento

Se contempla que los CAR utilizados en la o las poblaciones de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas se puedan utilizar en procedimientos para tratar o prevenir una enfermedad en un mamífero. A este respecto, una forma de realización proporciona un procedimiento para tratar o prevenir el cáncer en un mamífero, que comprende administrar al mamífero los CAR, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células huésped, la población de células, los anticuerpos y/o las porciones de unión a antígeno de los mismos y/o las composiciones farmacéuticas en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el cáncer en el mamífero.

Una forma de realización comprende además la linfodepleción del mamífero antes de administrar los CAR descritos en el presente documento. Los ejemplos de linfodepleción incluyen, pero sin limitación, quimioterapia linfodepletora no mieloablativa, quimioterapia linfodepletora mielosupresora, irradiación corporal total, etc.

Para los fines de los procedimientos, en los que se administran células huésped o poblaciones de células, las células pueden ser células alogénicas o autólogas con respecto al mamífero. Preferentemente, las células son autólogas con respecto al mamífero. Tal como se utiliza en el presente documento, alogénico significa cualquier material derivado de un animal diferente de la misma especie que el individuo al que se le introduce el material. Se dice que dos o más individuos son alogénicos entre sí cuando los genes en uno o más loci no son idénticos. En algunos aspectos, el material alogénico de individuos de la misma especie puede ser lo suficientemente diferente genéticamente como para interactuar antigénicamente. Tal como se utiliza en el presente documento, "autólogo" significa cualquier material derivado del mismo individuo al que más tarde se volverá a introducir.

El mamífero al que se hace referencia en el presente documento puede ser cualquier mamífero. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "mamífero" se refiere a cualquier mamífero, incluidos, entre otros, mamíferos del orden Rodentia, tales como ratones y hámsteres, y mamíferos del orden Logomorpha, tales como conejos. Los mamíferos pueden ser del orden Carnivora, incluidos felinos (gatos) y caninos (perros). Los mamíferos pueden ser del orden Artiodactyla, incluidos los bovinos (vacas) y los porcinos (cerdos) o del orden Perssodactyla, incluidos los equinos (caballos). Los mamíferos pueden ser del orden de los primates, cébidos o simioides (monos) o del orden de los antropoides (humanos y simios). Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

Con respecto a los procedimientos, el cáncer puede ser cualquier cáncer, incluido cualquiera de entre cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rabdomiosarcoma alveolar, cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma de vejiga), cáncer de huesos, cáncer de cerebro (por ejemplo, meduloblastoma), cáncer de mama, cáncer de ano, canal anal o anorrecto, cáncer de ojo, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de articulaciones, cáncer de cuello, vesícula biliar o pleura, cáncer de nariz, cavidad nasal u oído medio, cáncer de la cavidad oral, cáncer de vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, fibrosarcoma, tumor carcinoide gastrointestinal, cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia, tumores líquidos, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas y adenocarcinoma de pulmón), linfoma, mesotelioma, mastocitoma, melanoma, mieloma múltiple, cáncer nasofaringeo, linfoma no de Hodgkin, leucemia linfocítica crónica B (CLL), leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML) y linfoma de Burkitt, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, peritoneo, epiplón y cáncer de mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer de riñón, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, cáncer de tejidos blandos, tumores sólidos, sarcoma sinovial, cáncer gástrico, cáncer testicular, cáncer de tiroides y cáncer de uréter.

Los términos "tratar" y "prevenir", así como las palabras derivadas de los mismos, tal como se utilizan en el presente documento, no implican necesariamente un tratamiento o una prevención al 100% o completos. Más bien, existen diversos grados de tratamiento o prevención que un experto en la técnica reconoce que tienen un beneficio o efecto terapéutico potencial. A este respecto, los procedimientos pueden proporcionar cualquier cantidad o cualquier nivel de tratamiento o prevención del cáncer en un mamífero.

Además, el tratamiento o la prevención proporcionada por el procedimiento puede incluir el tratamiento o la prevención de una o más afecciones o síntomas de la enfermedad, por ejemplo, cáncer, que se está tratando o previniendo. Además, para los fines del presente documento, "prevención" puede abarcar retrasar la aparición de la enfermedad, o un síntoma o condición de la misma.

Otra forma de realización proporciona un procedimiento para detectar la presencia de cáncer en un mamífero, que comprende: (a) poner en contacto una muestra que comprende una o más células del mamífero con los CAR, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células huésped, la población de células, los anticuerpos y/o las porciones de unión a antígeno de los mismos, o las composiciones farmacéuticas, formando así un complejo, (b) y detectando el complejo, en el que la detección del complejo es indicativa de la presencia de cáncer en el mamífero.

La muestra se puede obtener mediante cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, biopsia o necropsia. Una biopsia es la extracción de tejido y/o células de un individuo. Dicha extracción puede ser para recolectar tejido y/o células del individuo con el fin de realizar experimentación en el tejido y/o células extraídos. Esta experimentación puede incluir experimentos para determinar si el individuo tiene y/o padece una determinada afección o estado de enfermedad. La afección o enfermedad puede ser, por ejemplo, cáncer.

Con respecto a una forma de realización del procedimiento para detectar la presencia de un trastorno proliferativo, por ejemplo, cáncer, en un mamífero, la muestra que comprende células del mamífero puede ser una muestra que comprende células enteras, lisados de las mismas o una fracción de los lisados de células completas, por ejemplo, una fracción nuclear o citoplásmica, una fracción de proteína completa o una fracción de ácido nucleico. Si la muestra comprende células completas, las células pueden ser cualquier célula del mamífero, por ejemplo, las células de cualquier órgano o tejido, incluidas células sanguíneas o células endoteliales.

El contacto puede tener lugar *in vitro* o *en vivo* con respecto al mamífero. Preferentemente, el contacto es *in vitro.*

Además, la detección del complejo puede tener lugar por medio de varias formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los CAR descritos en el presente documento, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células huésped, poblaciones de células o anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, descritos en el presente documento, pueden marcarse con un marcador detectable tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante) y partículas de elementos (por ejemplo, partículas de oro) tal como se ha divulgado en el presente documento anteriormente.

Se conocen en la técnica procedimientos de análisis de un CAR para determinar su capacidad para reconocer células diana y su especificidad con respecto al antígeno. Por ejemplo, Clay et al., J. Immunol, 163: 507-513 (1999), enseñan procedimientos para medir la liberación de citocinas (por ejemplo, interferón-y, factor estimulante de colonias de granulocitos/monocitos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral a (TNF-a) o interleucina 2 (IL-2)). Además, la función del CAR se puede evaluar midiendo la citotoxicidad celular, tal como se describe por Zhao et al., J. Immunol. 174: 4415-4423 (2005).

Otra forma de realización proporciona el uso de los CAR, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células huésped, poblaciones de células, anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos y/o composiciones farmacéuticas de la invención, para el tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo, por ejemplo, cáncer, en un mamífero. El cáncer puede ser cualquiera de los tipos de cáncer descritos en el presente documento.

Puede utilizarse cualquier procedimiento de administración para los agentes terapéuticos divulgados, incluida la administración local y sistémica. Por ejemplo, se puede utilizar la administración tópica, oral, intravascular, tal como intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, intradérmica, intratecal y subcutánea. El modo particular de administración y el régimen de dosificación los seleccionará el médico a cargo, teniendo en cuenta los detalles del caso (por ejemplo, el sujeto, la enfermedad, el estado patológico involucrado y si el tratamiento es profiláctico). En los casos en los que se administra más de un agente o de una composición, se pueden utilizar una o más vías de administración; por ejemplo, un agente quimioterapéutico puede administrarse por vía oral y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o conjugado o composición puede administrarse por vía intravenosa. Los procedimientos de administración incluyen la inyección para la cual el CAR, la célula CAR-T, los conjugados, los anticuerpos, los fragmentos de unión a antígeno o las composiciones se proporcionan en un vehículo no tóxico y farmacéuticamente aceptable, tal como agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, albúmina sérica humana al 5%, aceites fijos, oleato de etilo o liposomas. En algunas formas de realización, se puede utilizar la administración local de los compuestos divulgados, por ejemplo aplicando el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno a una región de tejido del que se ha eliminado un tumor, o una región que se sospecha que es propensa al desarrollo de tumores. En algunas formas de realización, la liberación intratumoral (o casi tumoral) mantenida de la preparación farmacéutica que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede ser beneficiosa. En otros ejemplos, el conjugado se aplica como un colirio por vía tópica en la córnea o por vía intravítrea en el ojo.

Los agentes terapéuticos divulgados se pueden formular en forma de dosificación unitaria adecuada para la administración individual de dosis precisas. Además, los agentes terapéuticos divulgados pueden administrarse en una sola dosis o en un programa de dosis múltiples. Un programa de dosis múltiple es aquel en el que un curso primario de tratamiento puede realizarse con más de una dosis separada, por ejemplo 1-10 dosis, seguido de otras dosis administradas en intervalos de tiempo posteriores según sea necesario para mantener o reforzar la acción de las composiciones. El tratamiento puede implicar dosis diarias o múltiples diarias de compuesto(s) durante un periodo de unos pocos días a meses, o incluso años. Por lo tanto, el régimen de dosificación también, al menos en parte, se determinará basándose en las necesidades particulares del sujeto que se va a tratar y dependerá del criterio del médico que lo administre.

Las dosis típicas de los anticuerpos o conjugados pueden oscilar entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 30 mg/kg, tal como entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 mg/kg.

En ejemplos particulares, al sujeto se le administra una composición terapéutica que incluye uno o más de los conjugados, anticuerpos, composiciones, CAR, células CAR-T o agentes adicionales, en un programa de dosificación diaria múltiple, tal como al menos dos días consecutivos, 10 días consecutivos días, etc., por ejemplo, durante un periodo de semanas, meses o años. En un ejemplo, al sujeto se le administran los conjugados, anticuerpos, composiciones o agentes adicionales durante un periodo de al menos 30 días, tal como al menos 2 meses, al menos 4 meses, al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 24 meses, o al menos 36 meses.

En algunas formas de realización, los procedimientos divulgados incluyen proporcionar cirugía, radioterapia y/o quimioterapia al sujeto en combinación con un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, conjugado, CAR o célula T que expresan un CAR (por ejemplo, secuencialmente, sustancialmente simultáneamente, o simultáneamente). Los expertos en la técnica conocen los procedimientos y las dosis terapéuticas de dichos agentes y tratamientos, y un médico experto puede determinarlos. Los programas de preparación y dosificación para el agente adicional se pueden utilizar según las instrucciones del fabricante o según lo determine empíricamente el médico experto. La preparación y los programas de dosificación para dicha quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service, (1992) Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

En algunas formas de realización, la terapia combinada puede incluir la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de cáncer adicional a un sujeto. Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos adicionales que se pueden utilizar con la terapia combinada incluyen agentes de unión a microtúbulos, intercaladores o reticuladores de ADN, inhibidores de la síntesis de ADN, inhibidores de la transcripción de ADN y ARN, anticuerpos, enzimas, inhibidores enzimáticos, reguladores de genes e inhibidores de la angiogénesis. Estos agentes (que se

administran en una cantidad terapéuticamente eficaz) y tratamientos pueden utilizarse solos o en combinación. Por ejemplo, cualquier agente anticancerígeno o antiangiogénico adecuado puede administrarse en combinación con las células CAR, células CAR-T, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno o conjugados descritos en el presente documento. Los expertos en la técnica conocen los procedimientos y las dosis terapéuticas de dichos agentes, y un médico experto puede determinarlos.

Los agentes quimioterapéuticos adicionales incluyen, pero sin limitación, agentes alquilantes, tales como mostazas de nitrógeno (por ejemplo, clorambucilo, clormetina, ciclofosfamida, ifosfamida y melfalán), nitrosoureas (por ejemplo, carmustina, fotemustina, lomustina y estreptozocina), compuestos de platino (por ejemplo, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino y BBR3464), busulfán, dacarbazina, mecloretamina, procarbazina, temozolomida, tiotepa y uramustina; antimetabolitos, tales como ácido fólico (por ejemplo, metotrexato, pemetrexed y raltitrexed), purina (por ejemplo, cladribina, clofarabina, fludarabina, mercaptopurina y tioguanina), pirimidina (por ejemplo, capecitabina), citarabina, fluorouracilo y gemcitabina; alcaloides vegetales, tales como podófilo (por ejemplo, etopósido y tenipósido), taxano (por ejemplo, docetaxel y paclitaxel), vinca (por ejemplo, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina); antibióticos citotóxicos/antitumorales, tales como miembros de la familia de las antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina, idarrubicina, mitoxantrona y valrubicina), bleomicina, rifampicina, hidroxiurea y mitomicina; inhibidores de la topoisomerasa, tales como topotecán e irinotecán; anticuerpos monoclonales, tales como alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, gemtuzumab, rituximab, panitumumab, pertuzumab y trastuzumab; fotosensibilizadores, tales como ácido aminolevulínico, aminolevulinato de metilo, porfímero sódico y verteporfina; y otros agentes, tales como alitretinoína, altretamina, amsacrina, anagrelida, trióxido de arsénico, asparaginasa, axitinib, bexaroteno, bevacizumab, bortezomib, celecoxib, denileucina diftitox, erlotinib, estramustina, gefitinib, hidroxicarbamida, imatinib, lapatinib, pazopanib, pentostatina, masoprocol, mitotano, pegaspargasa, tamoxifeno, sorafenib, sunitinib, vemurafinib, vandetanib y tretinoína. Los expertos en la técnica conocen la selección y las dosis terapéuticas de dichos agentes, y un médico experto puede determinarlas.

En determinadas formas de realización de la presente invención, las células activadas y expandidas utilizando los procedimientos descritos en el presente documento, u otros procedimientos conocidos en la técnica con los que las células T se expanden a niveles terapéuticos, se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, que incluyen, pero sin limitación, el tratamiento con agentes como terapia antiviral, cidofovir e interleucina-2, citarabina (también conocida como ARA-C) o tratamiento con natalizumab para pacientes con EM o tratamiento con efalizumab para pacientes con psoriasis u otros tratamientos para pacientes con PML. En otras formas de realización, las células T de la invención se pueden utilizar en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoablativos tales como CAM PATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias con anticuerpos, citoxina, fludaribina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas y radiación. Estos fármacos inhiben la fosfatasa calcineurina dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la quinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina) (Liu et al., Cell 66: 807-815, 1991; Henderson et al., Immun 73: 316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun 5: 763-773, 1993). En una forma de realización adicional, las composiciones de células de la presente invención se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) de un trasplante de médula ósea, terapia ablativa de células T utilizando agentes de quimioterapia tales como fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. En otra forma de realización, las composiciones de células de la presente invención se administran después de una terapia ablativa de células B tal como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, rituxán. Por ejemplo, en una forma de realización, los sujetos pueden someterse a un tratamiento estándar con quimioterapia de dosis alta seguido de un trasplante de células madre de sangre periférica. En determinadas formas de realización, después del trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunitarias expandidas de la presente invención. En una forma de realización adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

La dosis de los tratamientos anteriores que se administrarán a un paciente variará con la naturaleza precisa de la afección que se está tratando y el receptor del tratamiento. La escalada de dosis para la administración humana se puede realizar según las prácticas aceptadas en la técnica. Las dosis de CAMPATH, por ejemplo, se encontrarán generalmente en el intervalo de 1 a aproximadamente 100 mg para un paciente adulto, normalmente administrados diariamente durante un periodo de entre 1 y 30 días. La dosis diaria preferida es de 1 a 10 mg por día, aunque en algunos casos pueden usarse dosis mayores de hasta 40 mg por día.

La terapia combinada puede proporcionar sinergia y resultar sinérgica, es decir, el efecto logrado cuando los ingredientes activos utilizados juntos es mayor que la suma de los efectos que se obtienen utilizando los compuestos por separado. Se puede lograr un efecto sinérgico cuando los ingredientes activos: (1) se coformulan y se administran o se suministran simultáneamente en una formulación de dosis unitaria combinada; (2) se administran de forma alterna o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) mediante algún otro régimen. Cuando se administran de forma alterna, se puede lograr un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o se suministran secuencialmente, por ejemplo, mediante diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la alternancia, se administra secuencialmente una dosis eficaz de cada ingrediente activo, es decir, en serie, mientras que en la terapia combinada, se administran juntas dosis eficaces de dos o más ingredientes activos.

En una forma de realización, una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a uno o más de los antígenos divulgados en el presente documento o un conjugado de los mismos se administra a un sujeto que tiene un tumor después de un tratamiento anticanceroso. Después de que haya transcurrido una cantidad de tiempo suficiente para permitir que el anticuerpo administrado o el fragmento de unión a antígeno o el conjugado formen un inmunocomplejo con el antígeno expresado en la respectiva célula cancerosa, se detecta el inmunocomplejo. La presencia (o ausencia) del inmunocomplejo indica la eficacia del tratamiento. Por ejemplo, un aumento en el inmunocomplejo en comparación con un control tomado antes del tratamiento indica que el tratamiento no es eficaz, mientras que una disminución en el inmunocomplejo en comparación con un control tomado antes del tratamiento indica que el tratamiento es eficaz.

F. Composiciones biofarmacéuticas

Se proporcionan en el presente documento composiciones biofarmacéuticas o biológicas (en adelante, "composiciones") para su uso en terapia génica, inmunoterapia, inmunoterapia adoptiva y/o terapia celular que incluyen uno o más de los CAR divulgados, o células T que expresan un CAR, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, conjugados, CAR o células T que expresan un CAR que se unen específicamente a uno o más antígenos descritos en el presente documento, en un vehículo (tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable). Las composiciones se pueden preparar en formas de dosificación unitaria para su administración a un sujeto. La cantidad y el momento de administración quedan a discreción del médico tratante para lograr el resultado deseado. Las composiciones pueden formularse para administración sistémica (tal como intravenosa) o local (tal como intratumoral). En un ejemplo, un CAR, o células T que expresan un CAR, anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, conjugado, se formula para administración parenteral, tal como administración intravenosa. Las composiciones que incluyen un CAR, o células T que expresan un CAR, un conjugado, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno tal como se divulgan en el presente documento son útiles, por ejemplo, para el tratamiento y la detección de un tumor, por ejemplo, y no a modo de limitación, un neuroblastoma. En algunos ejemplos, las composiciones son útiles para el tratamiento o la detección de un carcinoma. Las composiciones que incluyen un CAR, o células T que expresan un CAR, un conjugado, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno tal como se divulgan en el presente documento también son útiles, por ejemplo, para la detección de angiogénesis patológica.

Las composiciones para administración pueden incluir una solución de CAR, o célula T que expresa un CAR, conjugado, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno disuelto en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un vehículo acuoso. Pueden utilizarse una diversidad de vehículos acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente están desprovistas de materiales no deseables. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requieran para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes ajustadores y reguladores del pH, agentes ajustadores de la toxicidad, agentes coadyuvantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración de un CAR, o célula T que expresa un CAR, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o conjugado en estas formulaciones puede variar ampliamente y se seleccionará principalmente en función de los volúmenes de líquido, viscosidades, peso corporal y similares según el modo de administración particular seleccionado y las necesidades del sujeto. Los procedimientos reales para preparar dichas formas de dosificación para su uso en terapia génica, inmunoterapia y/o terapia celular son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en la técnica.

Una composición típica para administración intravenosa incluye aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg/kg de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o conjugado por sujeto por día (o la dosis correspondiente de un conjugado de CAR, o célula T que expresa un CAR, incluyendo el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno). Los procedimientos reales para preparar composiciones administrables serán conocidos o evidentes para los expertos en la técnica y se describen con más detalle en publicaciones tales como *Remington's Pharmaceutical Science, 19ª ed.*, Mack Publishing Company, Easton, PA (1995).

Un CAR, o célula T que expresa un CAR, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno o conjugados pueden proporcionarse en forma liofilizada y rehidratarse con agua estéril antes de la administración, aunque también se proporcionan en soluciones estériles de concentración conocida. Los CAR, o células T que expresan un CAR, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno o una solución conjugada se añaden a una bolsa de infusión que contiene cloruro de sodio al 0,9%, USP, y en algunos casos se administran a una dosis de 0,5 a 15 mg/kg de peso corporal. Se dispone de una experiencia considerable en la técnica en la administración de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno y fármacos conjugados; por ejemplo, los fármacos de anticuerpos se han comercializado en Estados Unidos desde la aprobación de RITUXAN® en 1997. Un CAR, o célula T que expresa un CAR, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y conjugados de los mismos se pueden administrar mediante infusión lenta, en lugar de bolo intravenoso o en embolada intravenosa. En un ejemplo, se administra una dosis de carga más alta, y las dosis de mantenimiento posteriores se administran a un nivel más bajo. Por ejemplo, una dosis de carga inicial de 4 mg/kg de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (o la dosis correspondiente de un conjugado que incluye el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno) se puede infundir durante un periodo de unos 90 minutos, seguida de dosis de mantenimiento semanales durante 4-8 semanas de 2 mg/kg infundidos durante un periodo de 30 minutos si la dosis anterior fue bien tolerada.

Las formulaciones parenterales de liberación controlada se pueden preparar como implantes, inyecciones oleosas o como sistemas particulados. Para obtener una descripción general amplia de los sistemas de administración de proteínas, véase, Banga, A.J., *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems*, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, (1995). Los sistemas particulados incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica, tal como una citotoxina o un fármaco, como núcleo central. En las microesferas, el terapéutico se dispersa por toda la partícula. Las partículas, las microesferas y las microcápsulas menores de aproximadamente 1 µm se denominan generalmente nanopartículas, nanoesferas y nanocápsulas, respectivamente. Los capilares tienen un diámetro de aproximadamente 5 µm, por lo que solo se administran por vía intravenosa nanopartículas. Generalmente las micropartículas tienen aproximadamente 100 µm de diámetro y se administran por vía subcutánea o intramuscular. Véase, por ejemplo, Kreuter, J., *Colloidal Drug Delivery Systems*, J. Kreute, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, páginas 219-342 (1994); y Tice & Tabibi, *Treatise on Controlled Drug Delivery*, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. Nueva York, NY, páginas 315-339, (1992).

Se pueden utilizar polímeros para la liberación controlada de iones de los CAR, o las células T que expresan un CAR, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno o composiciones de conjugados divulgadas en el presente documento. Se conocen en la técnica diversas matrices poliméricas degradables y no degradables para su uso en la administración controlada de fármacos (Langer, *Accounts Chem. Res*. 26: 537-542, 1993). Por ejemplo, el copolímero de bloques, polaxámero 407, está presente como un líquido viscoso aunque móvil a bajas temperaturas pero forma un gel semisólido a la temperatura corporal. Se ha demostrado que es un vehículo eficaz para la formulación y el suministro mantenido de interleucina-2 recombinante y ureasa (Johnston et al., *Pharm. Res*. 9: 425-434, 1992; y Pec et al., *J. Parent. Sci. Tech.* 44 (2): 58-65, 1990). Alternativamente, se ha utilizado hidroxiapatita como microvehículo para la liberación controlada de proteínas (Ijntema et al., *Int. J. Pharm*. 112: 215-224, 1994). En otro aspecto más, se utilizan liposomas para la liberación controlada así como para el direccionamiento del fármaco encapsulado en lípidos (Betageri et al., *Liposome Drug Delivery Systems*, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA (1993)). Se conocen numerosos sistemas adicionales para la administración controlada de proteínas terapéuticas (véanse la patente de Estados Unidos Nº 5.055.303, la patente de Estados Unidos Nº 5.188.837, la patente de Estados Unidos Nº 4.235.871, la patente de Estados Unidos Nº 4.501.728, la patente de Estados Unidos Nº 4.837.028, la patente de Estados Unidos Nº 4.957.735, la patente de Estados Unidos Nº 5.019.369, la patente de Estados Unidos Nº 5.055.303, la patente de Estados Unidos Nº 5.514.670, la patente de Estados Unidos Nº 5.413.797, la patente de Estados Unidos Nº 5.268.164, la patente de Estados Unidos Nº 5.004.697, la patente de Estados Unidos Nº 4.902.505, la patente de Estados Unidos Nº 5.506.206, la patente de Estados Unidos Nº 5.271.961, la patente de Estados Unidos Nº 5.254.342 y la patente de Estados Unidos Nº 5.534.496).

G. Kits

En un aspecto, también se proporcionan kits que emplean los CAR divulgados en el presente documento. Por ejemplo, kits para tratar un tumor en un sujeto, o producir una célula CAR-T que expresa uno o más de los CAR divulgados en el presente documento. Los kits incluirán típicamente un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno, un conjugado, una molécula de ácido nucleico, un CAR o una célula T que expresa un CAR tal como se divulga en el presente documento. En el kit se pueden incluir más de uno de los anticuerpos descritos, fragmentos de unión a antígeno, conjugados, moléculas de ácido nucleico, CAR o células T que expresan un CAR.

El kit puede incluir un recipiente y una etiqueta o prospecto en el envase o de forma asociada con el mismo. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes se pueden formar a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene generalmente una composición que incluye uno o más de los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, conjugados, moléculas de ácido nucleico, CAR o células T que expresan un CAR divulgados. En varias formas de realización, el recipiente puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Una etiqueta o prospecto indica que la composición se utiliza para tratar la afección en cuestión.

La etiqueta o prospecto generalmente incluirá además instrucciones para el uso de los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, conjugados, moléculas de ácido nucleico, CAR o células T que expresan un CAR divulgados, por ejemplo, en un procedimiento para tratar o prevenir un tumor o producir una célula CAR-T. El prospecto incluye típicamente instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, contraindicaciones y/o advertencias con respecto al uso de dichos productos terapéuticos. El material de instrucción puede estar escrito, en forma electrónica (tal como un disquete de ordenador o disco compacto) o puede ser visual (tal como archivos de video). Los kits también pueden incluir componentes adicionales para facilitar la aplicación particular para la que está diseñado el kit. Así, por ejemplo, el kit puede contener adicionalmente medios para detectar un marcador (tales como sustratos enzimáticos para marcadores enzimáticos, conjuntos de filtros para detectar marcadores fluorescentes, marcadores secundarios apropiados tales como un anticuerpo secundario o similares). Los kits pueden incluir adicionalmente tampones y otros reactivos utilizados habitualmente para la puesta en práctica de un procedimiento particular. Dichos kits y contenidos apropiados son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes, que no deben interpretarse de ninguna forma como una imposición de limitaciones al alcance de la misma. Por el contrario, debe entenderse claramente que se puede recurrir a varias otras formas de realización, modificaciones y equivalentes de las mismas que, después de leer la descripción del presente documento, pueden venir a la mente de los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de la presente invención y/o las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1

Secuenciación de próxima generación del mutanoma tumoral

Este procedimiento se refiere a la secuenciación de próxima generación del material tumoral del paciente y a la identificación de las proteínas mutadas presentes en el tumor (formando un grupo denominado mutanoma). Estas secuencias se utilizarán como base para crear vectores que expresen proteínas tumorales mutantes. Cuando esté disponible, el material del paciente no asociado a tumores se utilizará para una comparación normal (tal como sangre periférica), al igual que las bases de datos del genoma humano disponibles públicamente. Los procedimientos de secuenciación de próxima generación son una técnica bien establecida en biología molecular y pueden encontrarse, por ejemplo, en Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al., 2013, Cancer Genome Landscapes, Science 339: 1546-1558.

Los Institutos Nacionales de Salud (National Institutes of Health, NIH) han proporcionado en línea el Atlas del Genoma del Cáncer (cancergenome.nih.gov). Allí se pueden encontrar mapas completos de los cambios genómicos clave en 33 tipos de cáncer. Los datos se canalizan a los NIH a través de centros de secuenciación de genoma (GSC) de TCGA (El Atlas del Genoma del Cáncer) específicos. Los datos en dos formatos, exoma completo y genoma completo están disponibles para cada caso de cáncer del TCGA secuenciado. El ADN no tumoral sirve como control para cada presentación. Tres centros financiados por el Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano (National Human Genome Research Institute, NHGRI) proporcionan la secuencia del genoma completo: The Broad Institute Sequencing Platform, Broad Institute (Plataforma de Secuenciación del Instituto Broad, Instituto Broad), Cambridge, Mass.; Human Genome Sequencing Center, Baylor College of Medicine (Centro de Secuenciación del Genoma Humano, Colegio de Medicina Baylor), Houston, Texas, y Genome Institute at Washington University, Washington University School of Medicine (el Instituto del Genoma de la Universidad de Washington, Escuela de Medicina de la Universidad de Washington), St. Louis, Missouri.

Si se contrata al Instituto Broad de forma individual, el servicio Human WES Express (Deep) ofrece pares de tumores normales o análisis de mutación somática que abarcan el 85% de las bases objetivo con una cobertura de 50 veces o superior (información consultada el 10 de junio de 2016, www.genomics.broadinstitute.org/products/while-exome-sequencing). Las muestras de tumores también se pueden secuenciar en un laboratorio acreditado por CAP con licencia CLIA en el Broad. Los servicios comerciales de secuenciación del genoma completo y exomas completos se proporcionan por Illumina (www.illumina.com/areas-of-interest/cancer/research.htlml), que ahora también ofrece una plataforma de descubrimiento de inmunogenicidad del tumor (ngs-immuno-oncology-application-spotlight-1170-2016-005-1.pdf). También están disponibles otros proveedores comerciales. Esta información se proporciona para demostrar que los servicios de secuenciación del genoma completo y del exoma completo están ampliamente disponibles en el mercado y, según datos históricos, el coste y la velocidad al proporcionar estas secuencias continuarán reduciéndose. El análisis genómico de muestras de tumores humanos es un servicio que se proporciona fácilmente o puede llevarse a cabo en el laboratorio utilizando instrumentos y sistemas proporcionados comercialmente.

Ejemplo 2

Secuenciación de próxima generación de TCR

El procedimiento se refiere al uso de técnicas de secuenciación para definir el complemento completo de receptores de células T en una muestra biológica. El material analizado incluirá el tumor del paciente, en cuyo caso estaremos describiendo los TCR presentes en el tumor. En la sangre periférica, describiremos los TCR comunes presentes, algunos de los cuales serán específicos del tumor. La secuenciación de próxima generación permite cuantificar la frecuencia de TCR específicos. La aplicación de la secuenciación de próxima generación para identificar pares específicos de cadenas alfa y beta de TCR es una técnica bien establecida en biología molecular (Dash P, Wang G, Thomas P, 2015, Single-cell analysis of T-cell receptor AB repertoire, en Immunosenecense: Methods and Protocols, Shaw AC (ed.), Methods in Molecular Biology, vol. 1343, Springer Science + Business Media, Nueva York).

Se han desarrollado una multiplicidad de enfoques utilizando técnicas actuales de biología molecular, incluidos los continuos desarrollos en la secuenciación de ADN automática, para determinar las secuencias de ADN que codifican la cadena alfa de TCR (TCRA) y la cadena beta de TCR (TCRB). Además, se han desarrollado varias técnicas para asignar qué TCRA está emparejado con el TCRB en los mismos linfocitos T, o población de células T que surgieron

de un precursor clónico. Por ejemplo, en 2012, Sun et al. demostraron la capacidad de secuenciar las cadenas alfa y beta de TCR a nivel de una célula individual a partir de células T CD8 clasificadas fenotípicamente. Sun X, Saito M, Sato Y, et al., 2012, Unbiased analysis of TCRA/B chains at the single-cell level in human CD8+ T-Cell subsets, PLoS ONE 7: e40386.

En 2014, Han et al. demostraron la secuenciación de TCRA y TCRB a partir de células T, en algunos casos clasificadas por su capacidad para secretar subconjuntos de citocinas específicas, aisladas mediante el sistema de captura de citocinas de Miltenyi Biotec (partículas inmunomagnéticas). Han A, Gianville J, Hansmann L, Davis MM, 2014, Linking T-cell receptor sequence to functional phenotype at the single-cell level, Nature Biotechnology 32: 684-692.

De forma similar, las secuencias que codifican las cadenas pesada y ligera que comprenden el repertorio de anticuerpos codificado por células B se han analizado mediante procedimientos de secuenciación de células individuales. DeKosky B, Kojima T, Rodin A, et al., 2015, In-depth determination and analysis of the human paired heavy- and light-chain antibody repertoire, Nature Medicine 21: 86-91.

Ejemplo 3

Creación de vectores lentivirales que expresan el mutanoma tumoral

Para conferir expresión del mutanoma a células presentadoras de antígeno, células presentadoras de antígeno derivadas del paciente, siendo un ejemplo no limitante las células dendríticas, se utilizaron vectores lentivirales (LV) para codificar las diez (diez es una aproximación y el número de LV puede variar de 1 a 100) proteínas mutantes más predominantes presentes en el mutanoma. Los LV pueden codificar un mutanoma que contiene los epítopos relevantes o clonar individualmente cada gen mutado en una multiplicidad de LV. Las DC también se pueden transducir con otros genes o ARN no codificante para potenciar el efecto de producir DC y/o células T altamente funcionales. Ejemplos no limitantes de dichos genes o ARN no codificante son IL-2, IL-4, IL-12, IL-17, IL-15, IL-21, IL-7, IL-4, GM-CSF. miR 21, miR221 y miR142-T. También se transdujeron con dichas proteínas para que faciliten la diferenciación de monocitos a DC, y después se desactivan una vez que se ha producido la diferenciación mediante el uso de promotores específicos de tejido y/o miARN específico de tejido, tal como se sabe en la técnica.

Los LV se generaron rápidamente mediante la transducción de una línea celular productora con un conjunto de plásmidos que codifican los genes constituyentes necesarios para producir un vector genético. Estos plásmidos se transfectan en la línea de células productoras como un conjunto, de acuerdo con los requisitos reguladores actuales. Uno de los plásmidos transfectados codifica la carga útil genética del LV, es decir, los genes deseados para ser entregados a la línea celular diana. Por lo tanto, una vez que se ha definido el mutanoma tumoral y se han seleccionado los genes mutados para expresión en la célula presentadora de antígeno, estos genes se transferirán a plásmidos que codifican una o más de las proteínas mutadas. Los LV pueden acomodar hasta 10.000 pares de bases. Por lo tanto, los LV pueden codificar hasta diez genes o genes individuales. Si se excede el tamaño del gen o los genes empaquetados permitidos, se generan dos o más poblaciones de LV para codificar el conjunto completo del mutanoma deseado. Los genes mutados que codifican el mutanoma se amplifican mediante PCR o se sintetizan directamente y se incluyen las secuencias apropiadas que permiten la clonación rápida en el plásmido del esqueleto del LV (el plásmido que codifica los genes de interés). Una vez que se produce el LV que codifica los genes del mutanoma deseados, este se utiliza para transducir células presentadoras de antígeno.

Ejemplo 4

Creación de vectores lentivirales que expresan TCR

Para conferir expresión de secuencias de TCR identificadas mediante la secuenciación del material del paciente, se utilizan LV para codificar cadenas de TCRA y TCRB de longitud completa. Después, estos vectores se utilizan para transducir las células T del paciente, creando así células T multiespecíficas (TCR nativos y transducidos).

La capacidad de clonar molecularmente, secuenciar y transferir un TCR humano utilizando un vector génico retroviral en células T humanas primarias está bien establecida en el campo. La célula T transducida gana la capacidad de dirigirse a células utilizando el TCR transferido por vector. Si la célula T transducida es clónica, se puede demostrar que ambos TCR, nativos y transferidos, son funcionales (Retroviral transduction of a T cell receptor specific for an Epstein-Barr virus-encoded peptide, Clinical Immunology, 98: 220-228, véase también Jurgens, et al., 2006, Transduction of primary lymphocytes with Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-specific T-cell receptor induces lysis of virus-infected cells: a novel strategy for the treatment of Hodgkin's disease and nasopharyngeal carcinoma, J Clinical Immunology, 26: 22-32).

Se crean LV que codifican uno o varios TCR, por ejemplo cuyas secuencias de TCRA y TCRB se derivaron de células T aisladas de una paciente con cáncer de ovario; y se utiliza este LV para transducir linfocitos autólogos de pacientes que se han aislado, activado y cultivado *in vitro*. Los ejemplos de medios de cultivo utilizados incluyen RPMI-1640 o TexMACS, con o sin suplementación con suero humano o albúmina sérica humana, y citocinas de apoyo tales como IL-2, IL-7, IL-15, IL-21 o una combinación de los mismos. La activación se ve facilitada por el uso de una nanomatriz

que tiene propiedades de unión anti-CD3 y anti-CD28, tal como el sistema Mitenyi TransACT. El cultivo se realiza de acuerdo con técnicas estándar en el campo (es decir, en matraces de cultivo de tejidos) o en una plataforma de cultivo automatizada, tal como CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). La presencia del nuevo TCR en la superficie de la población de células T transducidas del paciente puede demostrarse mediante tinción de anticuerpos para el TCRB específico que se transfirió, o mediante PCR para esas secuencias.

Esta población de células T activadas, que ahora portan uno o más TCR clonados derivados del paciente, se utiliza después para reconocer los antígenos cancerosos expresados por ese paciente. Por ejemplo, si el TCR se clonó originariamente a partir de una célula T derivada del paciente que fue activada por una célula dendrítica que expresaba el antígeno X, la población de células T transducidas se activa ahora al cocultivarla con una APC compatible con el tejido (tal como una célula dendrítica o célula B) que se ha transducido o transfectado para que exprese el antígeno X. Tras la transferencia de esta población de células T al paciente, se evidencia actividad antitumoral.

En otro ejemplo, el LV codifica un inhibidor para el TCR nativo, tal como un antisentido o ARNhc que se dirige específicamente al TCR endógeno pero no al TCR codificado en el vector, en el que el TCR codificado se modifica para que sea resistente a los efectos del ARN antisentido o ARNhc, creando así células T específicas de tumor que se dirigen al o a los antígenos, pero no al TCR endógeno. Estas células T modificadas genéticamente pueden tener propiedades mejoradas de seguridad y eficacia con respecto a las células T que también expresan el TCR endógeno.

En este ejemplo, se generan LV que expresan tanto TCR como CAR para permitir los efectos antitumorales. El TCR y el CAR se pueden expresar en el mismo vector o en diferentes vectores. Una forma de realización preferida es la producción de una multiplicidad de vectores para expresar los CAR, los TCR y cualquier otro gen o ácido nucleico no codificante deseados (denominados colectivamente cargas útiles) que podrían potenciar los efectos terapéuticos o profilácticos del medicamento.

Ejemplo 5

Creación de vectores lentivirales que expresan CAR

Un elemento clave es la transducción de células T del paciente con receptores antigénicos quiméricos (CAR). El CAR debe expresarse en la superficie de la célula T a un nivel suficiente para asegurar la activación adecuada de la célula T transducida al encontrar una célula diana de CAR. Por ejemplo, una célula T que porta CAR CD19 es estimulada por células B normales que expresan CD19 o por leucemias que expresan CD19. Los CAR no serán específicos para proteínas tumorales mutadas que se han identificado, sino que se dirigirán a las células B normales u otros tipos de células prescindibles que pueden estar presentes en el microentorno tumoral, tales como células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), macrófagos asociados a tumores (TAM), fibroblastos o fibrocitos asociados a tumores, u otros tipos de células presentes en el estroma tumoral.

En el caso de las células B, el perfil de seguridad de los CAR específicos de CD19 y CD20 está bien establecido. También se puede utilizar un CAR dual que se dirige tanto a CD19 como a CD20. Es la reactividad a estos antígenos heterólogos, o autoantígenos, lo que impulsará la expansión de las células T específicas del tumor en el cuerpo tras la infusión, y quizás también *in vitro* durante el cultivo (por ejemplo, si los antígenos se comparten con células dendríticas). Una lista no exhaustiva de antígenos es la siguiente: CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD14, CD11b, TIE-2, VEGFR1, VEGFR2. Las DC se pueden modificar genéticamente de forma adicional para mejorarlas expresando genes tales como GM-CSF, IL-4, TRP2 y/o IFN-alfa, como ejemplos no exhaustivos o tal como se ha descrito anteriormente. Las DC también se pueden utilizar para infusión en el paciente, si se desea. De esta forma, las DC servirían para cebar o impulsar la actividad de la población de células T transducidas que ahora expresa el TCR afín en el cuerpo.

Un ejemplo no limitante es la inclusión de otros elementos dentro de los vectores que podrían ajustar la expresión de las cargas útiles para potenciar u optimizar el efecto deseado. Estos incluyen, pero sin interrupción, interruptores genéticos, genes suicidas, elementos reostáticos y similares. Por ejemplo, la expresión de los CAR puede desearse solo durante un periodo de tiempo después del tratamiento y puede ser preferible desactivar la expresión de CAR pero mantener la expresión de TCR durante un periodo más largo en el cuerpo para que las células T modificadas genéticamente puedan continuar reconociendo el cuerpo en busca de células tumorales.

Ejemplo 6

Cultivo de DC y transducción con vectores lentivirales que expresan la biblioteca de mutanomas (DCmutn)

Para presentar proteínas mutantes a las células T del paciente, las células presentadoras de antígenos autólogas, tales como las células dendríticas (DC), se transducen para que expresen proteínas mutantes codificadas por el mutanoma, estando definidas las proteínas específicas expresadas por las proteínas mutantes más expresadas en el tumor. Este procedimiento *in vitro* permite un análisis y una evaluación precisos de las poblaciones de células T inmunoterapéuticas antes de la infusión.

Un ejemplo no limitante es el aislamiento de monocitos de la sangre periférica de pacientes en condiciones no GMP y en primer lugar transducirlos con una multiplicidad de LV que expresan los antígenos mutados y después diferenciarlos en células dendríticas utilizando IL-4 soluble y GM-CSF. Una vez que las células se han diferenciado, las células T del paciente se subcultivan con las células dendríticas para expandir las células T específicas del tumor. A continuación, las células T específicas del tumor se aíslan mediante varios procedimientos y los TCR específicos se secuencian y se determinan. A continuación, estos TCR se sintetizan y se clonan en LV para su uso en vectores que se fabrican en condiciones GMP como medicamento.

Otro ejemplo no limitante emplea el mismo aislamiento de monocitos y generación mediada por LV de células dendríticas específicas de antígeno, pero en condiciones GMP. Las células T del paciente se transducen con un CAR anti-CD19 LV antes de cultivarlas con las DC modificadas genéticamente durante menos de 4 días antes de que las células T específicas de antígeno, y posiblemente también las DC que expresan antígenos, se vuelvan a infundir al paciente, como medicamento terapéutico.

Ejemplo 7

Transducción de PBMC de pacientes con CAR (T-CAR)

Para facilitar la expansión de las células T y para escapar también de las señales supresoras de tumores en el cuerpo, las células T del paciente se transducen con CAR, tales como los que se dirigen a CD19, CD20 u otros autoantígenos prescindibles. Los CAR contienen tanto la "señal 1" que, por ejemplo, la proporciona la cadena CR3 zeta (la señal 1 se refiere a la normalmente remitida por el TCR al encontrar un complejo péptido-MHC afín e incluye la fosforilación de la cadena TCR-zeta), y la "señal 2" que viene proporcionada por CD137, CD28 u otras moléculas transductoras de señales de células T que se sabe que desempeñan un papel en la activación de células T y la inducción de expansiones y persistencia en células T (la señal 2 se refiere a aquellas señales requeridas para permitir biológicamente que células T que han recibido la señal 1 se estimulen adicionalmente y persistan *in vitro* o *in vivo* y pueden incluir la activación de la vía Jak-STAT, PI3 quinasa, subtipos de PKC, vía TRAF o vías NF-kappaB). La señal 1 y la señal 2 pueden estar codificadas por el mismo constructo CAR, o pueden distribuirse entre diferentes productos génicos codificados por LV que servirían para activar las células T al encontrar el ligando o los ligandos CAR específicos. La expresión del constructo CAR como un medio para asegurar la persistencia de la población de células T del paciente transducidas con TCR es un aspecto central de la inmunoterapia adoptiva descrita en el presente documento, ya que las señales de persistencia y supervivencia para las células T vienen proporcionadas por la CAR, incluso si el TCR específico de tumor es insuficiente para hacerlo.

Ejemplo 8

Transducción de PBMC del paciente con TCR (recT)

Se generan LV que expresan cadenas TCRA y TCRB identificadas por secuenciación de sangre tumoral y periférica. Dependiendo del número de pares TCRA y TCRB identificados, un LV puede codificar múltiples TCR, o se generan múltiples LV con un solo TCR, o una combinación de ambos. En el diseño de estos vectores se emplean técnicas específicas para identificar el emparejamiento de cadenas TCRA y TCRB, tal como se detalla en la descripción de la identificación de TCR basada en secuenciación de ADN anterior. Estas células T son reactivas al mutanoma tumoral tal como se presenta por DC o células B transducidas con LV o por células tumorales *in vivo.* Por lo tanto, las secuencias de TCR derivadas de una paciente con cáncer de ovario (ya sea de la sangre periférica o de linfocitos a partir de la escisión del tumor que se ha determinado que son reactivas al tumor, por ejemplo, por la expresión de un conjunto de marcadores de activación o por la reactividad a una APC que expresa una proteína codificada por el tumor, es decir, parte del mutanoma) se clonan molecularmente en un vector LV, y ese vector se utiliza para transducir las células T del paciente, de modo que la población de células T transducidas exprese ahora el TCR reactivo al tumor. La población de células T transducidas con el LV es reactiva al tumor y podría reinfundirse al paciente.

Ejemplo 9

Transducción de PBMC del paciente con CAR y TCR (recT-CAR)

En algunos casos, las células T del paciente se transducen tanto con al menos un CAR como con una multiplicidad de secuencias de TCR recombinantes (recT). Estas células T multiespecíficas modificadas genéticamente pueden reaccionar a células tumorales a través de TCR nativos o recT, mejorar el efecto antitumoral y permitir que las células T persistan en virtud del CAR. En este caso, una población de células T de una paciente con cáncer de ovario se transduce con uno o más vectores LV que codifican tanto un TCR (derivado originariamente de la paciente y que se ha determinado que es reactivo al tumor) como un CAR. El TCR sirve para activar y dirigir la actividad antitumoral y el CAR sirve para permitir la persistencia de la población de células T terapéuticas en el cuerpo. Para construir un caso en singular, el tumor de ovario se secuencia a nivel del genoma o del exoma y se identifica el antígeno X del tumor. A continuación, el antígeno X se transduce mediante un LV para que se exprese en una APC autóloga, tal como una célula dendrítica. A continuación, los linfocitos de la paciente se incuban conjuntamente con DC que expresan X y las células reactivas se secuencian para identificar las secuencias de TCRA y TCRB. Los pares TCRA y TCRB derivados

de esta secuenciación se utilizan después para construir un LV que exprese TCR específicos de X. Alternativamente, las células T reactivas a antígenos tumorales se identifican en virtud de otros marcadores de activación directamente de la sangre o del tejido tumoral y las secuencias TCRA y TCRB se identifican y se clonan en LV. A continuación, las células T de la paciente se activan en cultivo *ex vivo* con el reactivo TrasnAct (que estimula las células T por medio de CD3 y CD28) en medios de cultivo. Las células T activadas se transducen después con dos LV separados, uno que codifica el TCR y un segundo que codifica el o los TCR reactivos a X; o, un único vector que coexpresa un CAR y un TCR. La población de células T transducidas se expande después en cultivo para demostrar la expresión de los transgenes. Una vez que se ha verificado la expresión de las secuencias codificadas por LV, esta población de células T terapéuticas se vuelve a infundir en la paciente para obtener un efecto anticanceroso. Este enfoque se puede multimerizar aumentando X para incluir un mayor número de proteínas mutantes asociadas a tumores (productos de mutanoma). Este enfoque también se puede multimerizar identificando más de un TCR que esté asociado con células antitumorales o por reactividad con una APC que expresa varios antígenos tumorales derivados del mutanoma. La población de células T efectoras se infunde después en el paciente para obtener un efecto terapéutico, expresando así la población de células T policlonales un único TCR específico para X junto con un CAR, o expresando la población de células T policlonales una multiplicidad de TCR reactivos a varios antígenos del cáncer, también coexpresados con un CAR. Esta etapa clave de la invención describe una nueva población de células T efectoras derivada del paciente que se ha modificado genéticamente para que exprese un CAR contra un antígeno no esencial codificado por tejidos normales, tal como CD19 o CD20, y TCR específicos de tumor.

Ejemplo 10

Cocultivo de poblaciones de células T con DC transducidas

Para expandir las células T reactivas al tumor (independientemente de la transducción con CAR, recT, CAR y recT), las células T se cocultivan con DC que expresan un subconjunto del mutanoma tumoral. En una forma de realización, las células que expresan recT no requieren cultivo sobre DC ya que la combinación recT + CAR puede ser suficiente para expandir las células T reactivas al tumor en el cuerpo. El cocultivo con células presentadoras de antígeno tales como DC verifica la reactividad tumoral de los vectores de expresión de TCRA y TCRB y podría realizarse de forma rutinaria como ensayo. Las células se cultivan con una diversidad de posibles citocinas u otros factores para potenciar los efectos de la producción y la identificación de las células T específicas de antígeno. Las APC o DC también podrían cultivarse en presencia de factores para mejorar aún más la expansión de células T específicas de antígeno. Los ejemplos no limitantes son la adición de un inhibidor anti-PD1, o la adición de IL-12, pero hay muchos factores posibles que podrían someterse a ensayo y evaluarse para determinar sus efectos potenciadores durante el cocultivo.

Ejemplo 11

Expansión de la población de RecT-CAR-T mediante coadministración o administración secuencial de productos de células autólogas capaces de proporcionar señalización mediada por CAR o RecT a la población de células T terapéuticas

En una variante de este procedimiento, la DC transducida por mutanoma del VL (u otra APC) y las poblaciones de células T efectoras pueden infundirse o inyectarse al paciente. También es concebible que esta segunda población de células pudiera cultivarse durante un periodo de tiempo adicional y después infundirse, o criopreservarse y después administrarse una o varias veces consecutivas. Por ejemplo, las DC que expresan el mutanoma inyectadas por vía subcutánea, en un ganglio linfático u otros sitios del cuerpo, pueden potenciar la expansión y la función del recT o TCR antitumoral nativo que se han inyectado por vía intravenosa. En este escenario, la expresión de CAR impulsa la expansión de las poblaciones de células T transducidas al encontrar un antígeno normal para el que el CAR es específico. La introducción de la población de células dendríticas que expresan proteínas codificadas por mutanoma sirve para impulsar la función de las células T antitumorales en virtud de la recT expresada por la población de células T. También puede ser que el autoantígeno que impulsa el CAR, por ejemplo CD19, se extinga hasta tal punto que ya no expanda la población de células T terapéuticas. En este caso, las APC autólogas, por ejemplo, células dendríticas o células B criopreservadas, o células B inmortalizadas con virus de Epstein-Barr que se han inactivado, pueden utilizarse para expandir la población de recT-CAR-T. Además, la línea de células B inmortalizadas también se puede utilizar para expresar proteínas de mutanoma.

La inmortalización de células B del paciente con VEB es un servicio estándar disponible tanto en laboratorios académicos (por ejemplo, en la Facultad de Medicina de la Universidad de Carolina del Norte (University of North Carolina School of Medicine), véase https://unclineberger.org/research/core-facilities/tissueculture/b-cell-immortalization-services) y como servicio comercial (por ejemplo, consulte Applied Biologic Material, ABM, Inc., https://www.abmgood.com/EBV-Cell-Immortalization.html). Aquí, la célula B del paciente se expone al virus de Epstein-Barr (EBV), en forma de sobrenadante de cultivo, y se expanden las colonias de células B transformadas. Estas células autólogas derivadas del paciente se utilizan comúnmente en procedimientos genéticos, virológicos e inmunológicos.

Por lo tanto, este producto de células autólogas complementario servirá para expandir la población de células T terapéuticas en virtud de la expresión de la diana CAR así como el antígeno diana recT. Si el producto complementario

de APC no expresa la diana CAR, estimulará la población de células T terapéuticas mediante la expresión de las proteínas del mutanoma solamente.

Ejemplo 12

Poblaciones específicas de células T creadas para inmunoterapia

Las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento crean una serie de poblaciones de células T que son adecuadas para la inmunoterapia adoptiva. En todos los casos, cuando se incluye el CAR, su propósito no es reaccionar contra los propios antígenos tumorales, sino impulsar la expansión de las células T del paciente o dirigirse a las células inmunosupresoras, con o sin coexpresión de recT. Estas poblaciones de células se pueden resumir de la forma siguiente:

A. T-CAR cultivada con DCmutn, en la que la T-CAR se dirige a una célula diana inmunosupresora y la DCmutn expande las células T específicas de antígeno.

B. rec-T-CAR, no cultivada con DCmutn, en la que rec-T-CAR son células T modificadas genéticamente que también expresan CAR, pero las células en sí no se cultivaron sobre DC. Las TCR de rec-T se identificaron cultivando un conjunto separado de células T con células DCmutn.

C. rec-T-CAR, cultivada con DCmutn, en la que las células rec-T-CAR se generaron transduciendo células T del paciente con un CAR y cultivando las células sobre células DCmutn para expandir y aislar células T específicas de antígeno que expresan adicionalmente un CAR dirigido a la población de células supresoras del tumor y para longevidad/expansión de las poblaciones de células T.

D. rec-T, no cultivada con DCmutn, en la que las células rec-T son células T modificadas genéticamente que NO expresan CAR, y las células en sí mismas no se cultivaron sobre DC. Los TCR de rec-T se identificaron cultivando un conjunto separado de células T con células DCmutn.

E. rec-T, cultivada con DCmutn, en la que las células rec-T se cultivan con células DCmutn para obtener células T específicas del antígeno TCR.

F. una población de DC-mutanoma utilizada *in vitro,* y también puede servir como coadyuvante/vacuna *in vivo*, en el que la población de DC-mutanoma se utiliza como vacuna para impulsar la expansión de las células rec-T o rec-T-CAR en el cuerpo.

Ejemplo 13

Tipos alternativos de células T y donantes

Se pueden considerar dos variantes importantes del procedimiento de inmunoterapia adoptiva descrito en el presente documento con respecto a los tipos de células T y donantes alternativos.

La primera variación es la inmunoterapia adoptiva en el contexto del trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH). Se ha intentado el TCMH tanto en neoplasias malignas hematológicas como en tumores sólidos. Para la aplicación de los procedimientos descritos en el presente después del TCMH, las poblaciones de células T y DC (u otras APC) se derivan del donante de médula ósea (CMH) y las células T terapéuticas generadas, se infunden después del TCMH.

Así, un paciente con, por ejemplo, mieloma, tiene su cáncer secuenciado y el mutanoma definido. Los antígenos proteicos de mutanoma se expresan en APC del donante de CMH (en virtud de la transducción del VL). Las células T derivadas del donante de CMH se activan y se seleccionan para su uso directo, o para secuenciación de TCR, después de cocultivo con APC que expresan proteínas codificadas por mutanoma. El constructo CAR sigue siendo el mismo, como para las aplicaciones de la tecnología sin TCMH, ya que es reactivo a un autoantígeno normal.

La segunda variación es el uso de poblaciones de células T alternativas para la inmunoterapia adoptiva. Está bien establecido que los marcadores de activación de la superficie celular, tales como CD137, CD69, PD-1, CD25, MHC de clase II y otros, se utilizan a menudo para definir y aislar poblaciones de células T activadas (por ejemplo, utilizando reactivo de Miltenyi Biotec CliniMACS CD137-biotina o el reactivo CliniMACS CD25). Las poblaciones de células T activadas se aíslan de la sangre periférica, del tumor o tras la exposición a células dendríticas que expresan antígenos asociados a tumores (DCmutn) utilizando estos procedimientos. De forma similar, la capacidad de aislar linfocitos T activados que producen citocinas asociadas a la activación se puede utilizar como un medio para aislar células T reactivas a antígenos tumorales (por ejemplo, utilizando el sistema de captura de citocinas de Miltenyi Biotec CliniMACS (IFN-gamma)). Las poblaciones de células T efectoras también se clasifican en poblaciones de células específicas utilizando clasificación por perlas magnéticas, citometría de flujo, anticuerpo en fase sólida unido a una superficie plástica, ligando unido en fase sólida al marcador deseado expresado por el tipo de célula T deseado

adherido a una matriz, etc., de una manera en la que dichos tipos de células T se definen por la expresión de proteínas de la superficie celular (marcadores). Por ejemplo, las células CD4 que son reactivas al péptido mutante unido por la MHC de clase II o las células CD8 que son reactivas al péptido mutante unido a la MHC de clase I pueden aislarse utilizando perlas inmunomagnéticas CD4 o CD8 (por ejemplo, utilizando el reactivo de Miltenyi Biotec CliniMACS CD4 o el reactivo CliniMACS CD8). Estos tipos de células se utilizan después como una sola población (solo CD4, por ejemplo), o en combinaciones o proporciones específicas. De forma similar, se han utilizado marcadores de diferenciación de células T para seleccionar poblaciones específicas para inmunoterapia adoptiva. Estos marcadores de diferenciación se utilizan para seleccionar positivamente o negativamente poblaciones de células T de memoria o poblaciones de células T vírgenes (por ejemplo, utilizando el reactivo CliniMACS CD45RA o el reactivo CliniMACS CD62L). Además, podrían utilizarse aspectos fisiológicos específicos de las poblaciones de células T para identificar poblaciones de células T más primitivas que pueden expandirse mejor *in vivo* (por ejemplo, utilizando los reactivos que identifican poblaciones de células que expresan la enzima aldehído deshidrogenasa o la expresión de combinaciones específicas de canales de sodio (Na+) y de potasio (K+) en la superficie de las células T, véase Liepins A, et al., 1989, "Serotonin modulated Ca++ dependent K+ channels in alloimmune effector cell lytic function. Immunopharmacol Immunotoxicol 11: 165-178 y Gallin EK, 1986, Ionic channels in leukocytes, J Leukoc Bio 39: 241-254). Por lo tanto, en el ejemplo anterior, antes del cultivo de células T derivadas de un paciente con mieloma con APC (DCmutn), o después de la exposición de una población de células T no seleccionada a la APC, pero antes de la infusión en el paciente, los subconjuntos de células T se aislan como una población de células terapéuticas. En una aplicación, estos marcadores o características fisiológicas se utilizan para identificar con mayor precisión las células T reactivas a tumores y, por lo tanto, sirven como base para una identificación más eficaz de la secuencia TCRA y TCRB. En otra aplicación, la población de células T utilizada para inmunoterapia se preselecciona por determinados marcadores antes de la infusión en el paciente, pero después de la expresión inducida o recTCR y CAR mediante transducción con LV. En otra aplicación, las células T que expresan marcadores reactivos al tumor se seleccionan después del aislamiento del paciente, y este subconjunto seleccionado se cocultiva con APC (DCmutn) para identificar de forma más eficaz la secuencia TCRA y RCRB específica del tumor.

Si bien se han descrito varios detalles junto con las implementaciones ejemplares descritas anteriormente, pueden resultar evidentes varias alternativas, modificaciones, variaciones, mejoras y/o equivalentes sustanciales, ya sean conocidos, o sean o puedan ser imprevistos actualmente, al revisar la descripción anterior.

Listado de secuencias

<110> MILTENYI BIOTEC TECHNOLOGY, INC.

<120> Procedimiento para tratar cáncer con células T modificadas genéticamente

<130> 21326-102

<140> PCT/US2016/037120
<141> 12/06/2016

<150> 62/175.003
<151> 12/06/2015

<160> 21

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 1

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgcgaactgc cgcatccggc gtttctgctg 60

attccg 66

<210> 2
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 2

```
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1               5                   10                  15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro
            20
```

<210> 3
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 3

```
atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtggggtcc ttctcctgtc actggttatc   60

acccttttact gc                                                      72
```

<210> 4
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 4

```
Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu
1               5                   10                  15

Val Ile Thr Leu Tyr Cys
            20
```

<210> 5
<211> 135
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<400> 5

```
accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagcccctg   60

tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcgggggggcg cagtgcacac gagggggctg  120

gacttcgcct gtgat                                                   135
```

<210> 6
<211> 47
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 6

```
Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
1               5                   10                  15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
            20                  25                  30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr
        35                  40                  45
```

<210> 7
<211> 42
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 7

```
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1               5                   10                  15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
            20                  25                  30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
        35                  40
```

<210> 8
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 8

```
Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1               5                   10                  15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
            20                  25                  30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
        35                  40                  45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
    50                  55                  60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65                  70                  75                  80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
                85                  90                  95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
            100                 105
```

<210> 9

<211> 126
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<400> 9

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60

actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120

gaactg 126

<210> 10
<211> 42
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 10

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 11
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<400> 11

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc 60

tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120

cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180

gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240

cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300

tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336

<210> 12
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 12

```
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
1               5                   10                  15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
            20                  25                  30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
        35                  40                  45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
    50                  55                  60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65                  70                  75                  80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
                85                  90                  95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
            100                 105                 110
```

<210> 13
<211> 1467
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<400> 13

```
atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgcgaactgc cgcatccggc gtttctgctg       60
attccggata ttcagatgac ccagaccacc agcagcctga gcgcgagcct gggcgatcgc      120
gtgaccatta gctgccgcgc gagccaggat attagcaaat atctgaactg gtatcagcag      180
aaaccggatg gcaccgtgaa actgctgatt tatcatacca gccgcctgca tagcggcgtg      240
ccgagccgct ttagcggcag cggcagcggc accgattata gcctgaccat tagcaacctg      300
gaacaggaag atattgcgac ctatttttgc cagcagggca acaccctgcc gtataccttt      360
ggcggcggca ccaaactgga aattaccggc ggcggcggca gcggcggcgg cggcagcggc      420
ggcggcggca gcgaagtgaa actgcaggaa agcggcccgg gcctggtggc gccgagccag      480
agcctgagcg tgacctgcac cgtgagcggc gtgagcctgc cggattatgg cgtgagctgg      540
attcgccagc cgccgcgcaa aggcctggaa tggctgggcg tgatttgggg cagcgaaacc      600
acctattata acagcgcgct gaaaagccgc ctgaccatta ttaaagataa cagcaaaagc      660
```

caggtgtttc tgaaaatgaa cagcctgcag accgatgata ccgcgattta ttattgcgcg 720

aaacattatt attatggcgg cagctatgcg atggattatt ggggccaggg caccagcgtg 780

accgtgagca gcgcggcggc gccggcgccg cgcccgccga ccccggcgcc gaccattgcg 840

agccagccgc tgagcctgcg cccggaagcg tgccgcccgg cggcgggcgg cgcggtgcat 900

acccgcggcc tggattttgt gcagccgatg gcgctgattg tgctgggcgg cgtggcgggc 960

ctgctgctgt ttattggcct gggcattttt ttttgcgtgc gctgccgccc gcgccgcaaa 1020

aaactgctgt atatttttaa acagccgttt atgcgcccgg tgcagaccac ccaggaagaa 1080

gatggctgca gctgccgctt tccggaagaa gaagaaggcg gctgcgaact gcgcgtgaaa 1140

tttagccgca gcgcggatgc gccggcgtat cagcagggcc agaaccagct gtataacgaa 1200

ctgaacctgg gccgccgcga agaatatgat gtgctggata aacgccgcgg ccgcgatccg 1260

gaaatgggcg gcaaaccgcg ccgcaaaaac ccgcaggaag gcctgtataa cgaactgcag 1320

aaagataaaa tggcggaagc gtatagcgaa attggcatga aaggcgaacg ccgccgcggc 1380

aaaggccatg atggcctgta tcagggcctg agcaccgcga ccaaagatac ctatgatgcg 1440

ctgcatatgc aggcgctgcc gccgcgc 1467

<210> 14
<211> 485
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 14

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
50 55 60

Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
85 90 95

```
Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
            100                 105                 110

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
        115                 120                 125

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
145                 150                 155                 160

Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
                165                 170                 175

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu
            180                 185                 190

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
        195                 200                 205

Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
    210                 215                 220

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
225                 230                 235                 240

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
                245                 250                 255

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Pro Ala Pro Arg Pro
            260                 265                 270

Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
        275                 280                 285

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
    290                 295                 300

Asp Phe Val Gln Pro Met Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly
305                 310                 315                 320

Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys Arg
                325                 330                 335

Pro Arg Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg
            340                 345                 350
```

```
Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro
        355                 360                 365

Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
    370                 375                 380

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
385                 390                 395                 400

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
                405                 410                 415

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
            420                 425                 430

Glu Gly Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
        435                 440                 445

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Gln
    450                 455                 460

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
465                 470                 475                 480

Ala Leu Pro Pro Arg
                485
```

<210> 15
<211> 726
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<400> 15

```
gacatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc       60

atcagttgca gggcaagtca ggacattagt aaatatttaa attggtatca gcagaaacca      120

gatggaactg ttaaactcct gatctaccat acatcaagat tacactcagg agtcccatca      180

aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa      240

gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtacac gttcggaggg      300

gggaccaagc tggagatcac aggtggcggt ggctcgggcg gtggtgggtc gggtggcggc      360

ggatctgagg tgaaactgca ggagtcagga cctggcctgg tggcgccctc acagagcctg      420

tccgtcacat gcactgtctc aggggtctca ttacccgact atggtgtaag ctggattcgc      480

cagcctccac gaaagggtct ggagtggctg ggagtaatat ggggtagtga aaccacatac      540

tataattcag ctctcaaatc cagactgacc atcatcaagg acaactccaa gagccaagtt      600

ttcttaaaaa tgaacagtct gcaaactgat gacacagcca tttactactg tgccaaacat      660

tattactacg gtggtagcta tgctatggac tactggggcc aaggaacctc agtcaccgtc      720

tcctca                                                                 726
```

<210> 16

<211> 242
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 16

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
            20                  25                  30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu
        115                 120                 125

Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys
    130                 135                 140
Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg
145                 150                 155                 160

Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser
                165                 170                 175
Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile
            180                 185                 190

Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln
        195                 200                 205

Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly
    210                 215                 220

Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
225                 230                 235                 240

Ser Ser
```

<210> 17
<211> 1485

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<400> 17

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgcgaactgc cgcatccggc gtttctgctg 60

attccggata ccgatattca gatgacccag accaccagca gcctgagcgc gagcctgggc 120

gatcgcgtga ccattagctg ccgcgcgagc caggatatta gcaaatatct gaactggtat 180

cagcagaaac cggatggcac cgtgaaactg ctgatttatc ataccagccg cctgcatagc 240

ggcgtgccga gccgctttag cggcagcggc agcggcaccg attatagcct gaccattagc 300

aacctggaac aggaagatat tgcgacctat ttttgccagc agggcaacac cctgccgtat 360

acctttggcg gcggcaccaa actggaaatt accggcagca ccagcggcag cggcaaaccg 420

ggcagcggcg aaggcagcac caaaggcgaa gtgaaactgc aggaaagcgg cccgggcctg 480

gtggcgccga gccagagcct gagcgtgacc tgcaccgtga gcggcgtgag cctgccggat 540

tatggcgtga gctggattcg ccagccgccg cgcaaaggcc tggaatggct gggcgtgatt 600

tggggcagcg aaaccaccta ttataacagc gcgctgaaaa gccgcctgac cattattaaa 660

gataacagca aaagccaggt gtttctgaaa atgaacagcc tgcagaccga tgataccgcg 720

atttattatt gcgcgaaaca ttattattat ggcggcagct atgcgatgga ttattggggc 780

cagggcacca gcgtgaccgt gagcagcgcg gcggcgacca ccaccccggc gccgcgcccg 840

ccgaccccgg cgccgaccat tgcgagccag ccgctgagcc tgcgcccgga agcgtgccgc 900

ccggcggcgg gcggcgcggt gcatacccgc ggcctggatt ttgcgtgcga tatttatatt 960

tgggcgccgc tggcgggcac ctgcggcgtg ctgctgctga gcctggtgat taccctgtat 1020

tgcaaacgcg gccgcaaaaa actgctgtat atttttaaac agccgtttat gcgcccggtg 1080

cagaccaccc aggaagaaga tggctgcagc tgccgctttc cggaagaaga agaaggcggc 1140

tgcgaactgc gcgtgaaatt tagccgcagc gcggatgcgc cggcgtatca gcagggccag 1200

aaccagctgt ataacgaact gaacctgggc cgccgcgaag aatatgatgt gctggataaa 1260

cgccgcggcc gcgatccgga atgggcggc aaaccgcgcc gcaaaaaccc gcaggaaggc 1320

ctgtataacg aactgcagaa agataaaatg gcggaagcgt atagcgaaat tggcatgaaa 1380

ggcgaacgcc gccgcggcaa aggccatgat ggcctgtatc agggcctgag caccgcgacc 1440

aaagatacct atgatgcgct gcatatgcag gcgctgccgc cgcgc 1485

<210> 18
<211> 491
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 18

```
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1               5                  10                  15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr
            20                  25                  30

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg
        35                  40                  45

Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60

Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser
65                  70                  75                  80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser
                85                  90                  95

Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys
            100                 105                 110

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
        115                 120                 125

Glu Ile Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu
```

```
    130                 135                 140

Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
145                 150                 155                 160

Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val
                165                 170                 175

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys
            180                 185                 190

Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr
        195                 200                 205

Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys
    210                 215                 220

Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala
225                 230                 235                 240

Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met
                245                 250                 255

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala
            260                 265                 270

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
        275                 280                 285

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
    290                 295                 300

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile
305                 310                 315                 320

Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val
                325                 330                 335

Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
            340                 345                 350

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
        355                 360                 365

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg
    370                 375                 380
```

```
Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
385                 390                 395                 400

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
                405                 410                 415

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
            420                 425                 430

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
        435                 440                 445

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
    450                 455                 460

Lys Gly His Asp Gly Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
465                 470                 475                 480

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
                485                 490
```

<210> 19
<211> 1470
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<400> 19

```
atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgcgaactgc cgcatccggc gtttctgctg       60

attccggata ttcagatgac ccagaccacc agcagcctga gcgcgagcct gggcgatcgc      120

gtgaccatta gctgccgcgc gagccaggat attagcaaat atctgaactg gtatcagcag      180

aaaccggatg gcaccgtgaa actgctgatt tatcatacca gccgcctgca tagcggcgtg      240

ccgagccgct ttagcggcag cggcagcggc accgattata gcctgaccat tagcaacctg      300

gaacaggaag atattgcgac ctatttttgc cagcagggca acaccctgcc gtataccttt      360

ggcggcggca ccaaactgga aattaccggc ggcggcggca gcggcggcgg cggcagcggc      420

ggcggcggca gcgaagtgaa actgcaggaa agcggcccgg gcctggtggc gccgagccag      480

agcctgagcg tgacctgcac cgtgagcggc gtgagcctgc cggattatgg cgtgagctgg      540

attcgccagc cgccgcgcaa aggcctggaa tggctgggcg tgatttgggg cagcgaaacc      600

acctattata acagcgcgct gaaaagccgc ctgaccatta ttaaagataa cagcaaaagc      660

caggtgtttc tgaaaatgaa cagcctgcag accgatgata ccgcgattta ttattgcgcg      720

aaacattatt attatggcgg cagctatgcg atggattatt ggggccaggg caccagcgtg      780
```

accgtgagca gcgcggcggc gaccaccacc ccggcgccgc gcccgccgac cccggcgccg 840

accattgcga gccagccgct gagcctgcgc ccggaagcgt gccgcccggc ggcgggcggc 900

gcggtgcata cccgcggcct ggattttgcg tgcgatattt atatttgggc gccgctggcg 960

ggcacctgcg gcgtgctgct gctgagcctg gtgattaccc tgtattgcaa acgcggccgc 1020

aaaaaactgc tgtatatttt taaacagccg tttatgcgcc cggtgcagac cacccaggaa 1080

gaagatggct gcagctgccg ctttccggaa gaagaagaag gcggctgcga actgcgcgtg 1140

aaatttagcc gcagcgcgga tgcgccggcg tatcagcagg gccagaacca gctgtataac 1200

gaactgaacc tgggccgccg cgaagaatat gatgtgctgg ataaacgccg cggccgcgat 1260

ccggaaatgg gcggcaaacc gcgccgcaaa aacccgcagg aaggcctgta taacgaactg 1320

cagaaagata aaatggcgga agcgtatagc gaaattggca tgaaaggcga acgccgccgc 1380

ggcaaaggcc atgatggcct gtatcagggc ctgagcaccg cgaccaaaga tacctatgat 1440

gcgctgcata tgcaggcgct gccgccgcgc 1470

<210> 20
<211> 486
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 20

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
50 55 60

Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
100 105 110

```
Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
        115                 120                 125

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
145                 150                 155                 160

Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
                165                 170                 175

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu
            180                 185                 190

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
        195                 200                 205

Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
    210                 215                 220

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
225                 230                 235                 240

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
                245                 250                 255

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr Thr Pro Ala
            260                 265                 270

Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
        275                 280                 285

Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
    290                 295                 300

Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
305                 310                 315                 320

Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
                325                 330                 335

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
            340                 345                 350

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
        355                 360                 365
```

```
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
    370                 375                 380

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
385                 390                 395                 400

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
                405                 410                 415

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
            420                 425                 430

Gln Glu Gly Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
        435                 440                 445

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
    450                 455                 460

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
465                 470                 475                 480

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
                485
```

<210> 21
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 21

```
Gly Phe Leu Gly
1
```

REIVINDICACIONES

1. Una composición de inmunoterapia adoptiva que comprende una población de células T autólogas transducidas con uno o más vectores lentivirales que codifican un único o múltiples receptores antigénicos quiméricos (CAR), en la que la población de células T se transduce adicionalmente con uno o más vectores lentivirales que codifican receptores de células T (TCR) específicos de tumor, y en la que las células T se cocultivan con células presentadoras de antígeno autólogas transducidas con uno o más vectores lentivirales que expresan antígenos tumorales derivados del paciente, generando así una población de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas capaces de promover la expansión *in vivo*, la persistencia de células T antitumorales específicas del paciente, lo que da como resultado la estabilización, la reducción y/o la eliminación del tumor y/o la remisión y/o la eliminación del cáncer de una forma específica del paciente.

2. La composición de inmunoterapia adoptiva de la reivindicación 1, en la que las células T autólogas específicas del paciente que contienen el receptor de células T (TCR) específico de tumor y específico del paciente se transducen con un vector lentiviral para que expresen receptores antigénicos quiméricos (CAR) durante o después del cocultivo con células presentadoras de antígeno autólogas transducidas con uno o más vectores lentivirales que expresan antígenos tumorales derivados del paciente para generar una población de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas capaces de reconocer dichos receptores de células T (TCR) específicos de tumor y capaces de promover la expansión *in vivo*, la persistencia de células T antitumorales específicas del paciente, lo que da como resultado la estabilización, la reducción y/o la eliminación del tumor y/o la remisión y/o la eliminación del cáncer de una forma específica del paciente.

3. La composición de inmunoterapia adoptiva de la reivindicación 1, en la que los receptores de células T (TCR) específicos de tumor se identificaron en primer lugar mediante el cocultivo de células presentadoras de antígenos (APC) transducidas con uno o más vectores lentivirales que expresan antígenos tumorales derivados del paciente con las células T compatibles con HLA o específicas del paciente, opcionalmente en la que los receptores de células T (TCR) específicos de tumor son compatibles con HLA o específicos del paciente.

4. La composición de inmunoterapia adoptiva de la reivindicación 1, en la que el CAR comprende al menos un dominio de unión a antígeno extracelular, al menos un dominio enlazador, al menos un dominio transmembrana y al menos un dominio de señalización intracelular, opcionalmente en la que el, al menos un, dominio de unión a antígeno extracelular del CAR comprende al menos un fragmento variable monocatenario de un anticuerpo que se une al antígeno, opcionalmente en la que el, al menos un, dominio de unión a antígeno extracelular del CAR comprende al menos una región variable de cadena pesada de un anticuerpo que se une al antígeno, opcionalmente en la que el, al menos un, dominio de unión a antígeno extracelular del CAR, el, al menos un, dominio de señalización intracelular del CAR, o ambos están conectados al dominio transmembrana mediante un dominio enlazador o espaciador, opcionalmente en la que el dominio de unión a antígeno extracelular del CAR está precedido por un péptido líder, opcionalmente en la que el dominio de unión a antígeno extracelular del CAR se dirige a un antígeno que comprende CD19, CD20, CD22, ROR1, TSLPR, mesotelina, CD33, CD38, CD123 (IL3RA), CD138, BCMA (CD269), GPC2, GPC3, FGFR4, c-Met, PSMA, glicolípido F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR, o cualquier combinación de los mismos, en la que opcionalmente el dominio de unión a antígeno extracelular del CAR comprende un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD19, un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD20, un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD22, un dominio de unión a antígeno scFV anti-ROR1, un dominio de unión a antígeno scFV anti-TSLPR, un dominio de unión a antígeno scFV anti-mesotelina, un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD33, un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD38, un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD123 (IL3RA), un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD138, un dominio de unión a antígeno scFV anti-BCMA (CD269), un dominio de unión a antígeno scFV anti-GPC2, un dominio de unión a antígeno scFV anti-GPC3, un dominio de unión a antígeno scFV anti-FGFR4, un dominio de unión a antígeno scFV anti-c-Met, un dominio de unión a antígeno scFV anti-PSMA, un dominio de unión a antígeno scFV anti-glicolípido F77, un dominio de unión a antígeno scFV anti-EGFRvIII, un dominio de unión a antígeno scFV anti-GD-2, un dominio de unión a antígeno scFV anti-NY-ESo-1 TCR, un dominio de unión a antígeno scFV anti-MAGE A3 TCR, o una secuencia de aminoácidos con el 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.

5. La composición de inmunoterapia adoptiva de la reivindicación 1, en la que el dominio enlazador o espaciador del CAR se deriva del dominio extracelular de CD8 y está enlazado al dominio transmembrana.

6. La composición de inmunoterapia adoptiva de la reivindicación 1, en la que el CAR comprende además un dominio transmembrana que comprende un dominio transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9 , CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, CD271, TNFRSF19 o cualquier combinación de los mismos.

7. La composición de inmunoterapia adoptiva de la reivindicación 1, en la que el, al menos un, dominio de señalización intracelular comprende además un dominio intracelular CD3 zeta, opcionalmente en la que el, al menos un, dominio de señalización intracelular está dispuesto en un lado C-terminal con respecto al dominio intracelular CD3 zeta,

opcionalmente en la que el, al menos un, dominio de señalización intracelular comprende un dominio coestimulador, un dominio de señalización primario o cualquier combinación de los mismos.

8. La composición de inmunoterapia adoptiva de la reivindicación 1, en la que el, al menos un, dominio coestimulador comprende un dominio de señalización funcional de OX40, CD70, CD27, CD28, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), DAP10, DAP12 y 4-1BB (CD137), o cualquier combinación de los mismos.

9. Una composición farmacéutica que comprende una población de células T autólogas transducidas con uno o más vectores lentivirales que codifican un único o múltiples receptores antigénicos quiméricos (CAR), en la que la población de células T se transduce adicionalmente con uno o más vectores lentivirales que codifican receptores de células T (TCR) específicos de tumor, y en la que las células T se cocultivan con células presentadoras de antígeno autólogas transducidas con uno o más vectores lentivirales que expresan antígenos tumorales derivados del paciente, generando así una población de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas capaces de promover la expansión *in vivo*, la persistencia de células T antitumorales específicas del paciente, lo que da como resultado la estabilización, la reducción y/o la eliminación del tumor y/o la remisión y/o la eliminación del cáncer de una forma específica del paciente.

10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que las células T son células T de un ser humano que padece un cáncer hematológico, por ejemplo en la que el cáncer hematológico es leucemia o linfoma, por ejemplo en la que la leucemia es leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML) o leucemia mieloide crónica (CML), por ejemplo, en la que el linfoma es linfoma de células del manto, linfoma no de Hodgkin o linfoma de Hodgkin, o en la que el cáncer hematológico es mieloma múltiple.

11. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en el que el cáncer humano incluye un carcinoma adulto que comprende cáncer bucal y de faringe (lengua, boca, faringe, cabeza y cuello), cánceres del sistema digestivo (esófago, estómago, intestino delgado, colon, recto, ano, hígado, conducto biliar intrahepático, vesícula biliar, páncreas), cánceres del sistema respiratorio (laringe, pulmón y bronquios), cánceres de huesos y articulaciones, cánceres de tejidos blandos, cánceres de piel (melanoma, carcinoma de células basales y escamosas), tumores pediátricos (neuroblastoma, rabdomiosarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing), tumores del sistema nervioso central (cerebro, astrocitoma, glioblastoma, glioma) y cánceres de mama, del sistema genital (cuello uterino, cuerpo uterino, ovario, vulva, vagina, próstata, testículos, pene, endometrio), del sistema urinario (vejiga urinaria, riñón y pelvis renal, uréter), del ojo y de la órbita, del sistema endocrino (tiroides) y del cerebro y el resto del sistema nervioso, o cualquier combinación de los mismos.

12. Una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de tratamiento de un mamífero que padece una enfermedad, trastorno o afección asociada con una expresión elevada de un antígeno tumoral, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto la composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz antitumoral de una población de células T autólogas transducidas con uno o más vectores lentivirales que codifican un único o múltiples receptores antigénicos quiméricos (CAR), en la que la población de células T se transduce adicionalmente con uno o más vectores lentivirales que codifican receptores de células T (TCR) específicos de tumor, y en la que las células T se cocultivan con células presentadoras de antígenos autólogos transducidas con uno o más vectores lentivirales que expresan antígenos tumorales derivados del paciente, generando así una población de células T antitumorales autólogas específicas del paciente activas capaces de promover la expansión *in vivo*, la persistencia de células T antitumorales específicas del paciente, lo que da como resultado la estabilización, la reducción y/o la eliminación del tumor y/o la remisión y/o la eliminación del cáncer de una forma específica del paciente.

13. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en la que la población de células T se ha preseleccionado en virtud de la expresión de marcadores de superficie de activación o asociados a la memoria específicos.

14. La composición farmacéutica para su uso según las reivindicaciones 12 y 13, en la que las células T y las células dendríticas se derivan de un donante de células madre hematopoyéticas y en la que el procedimiento se lleva a cabo en el contexto de un trasplante de células madre hematopoyéticas.

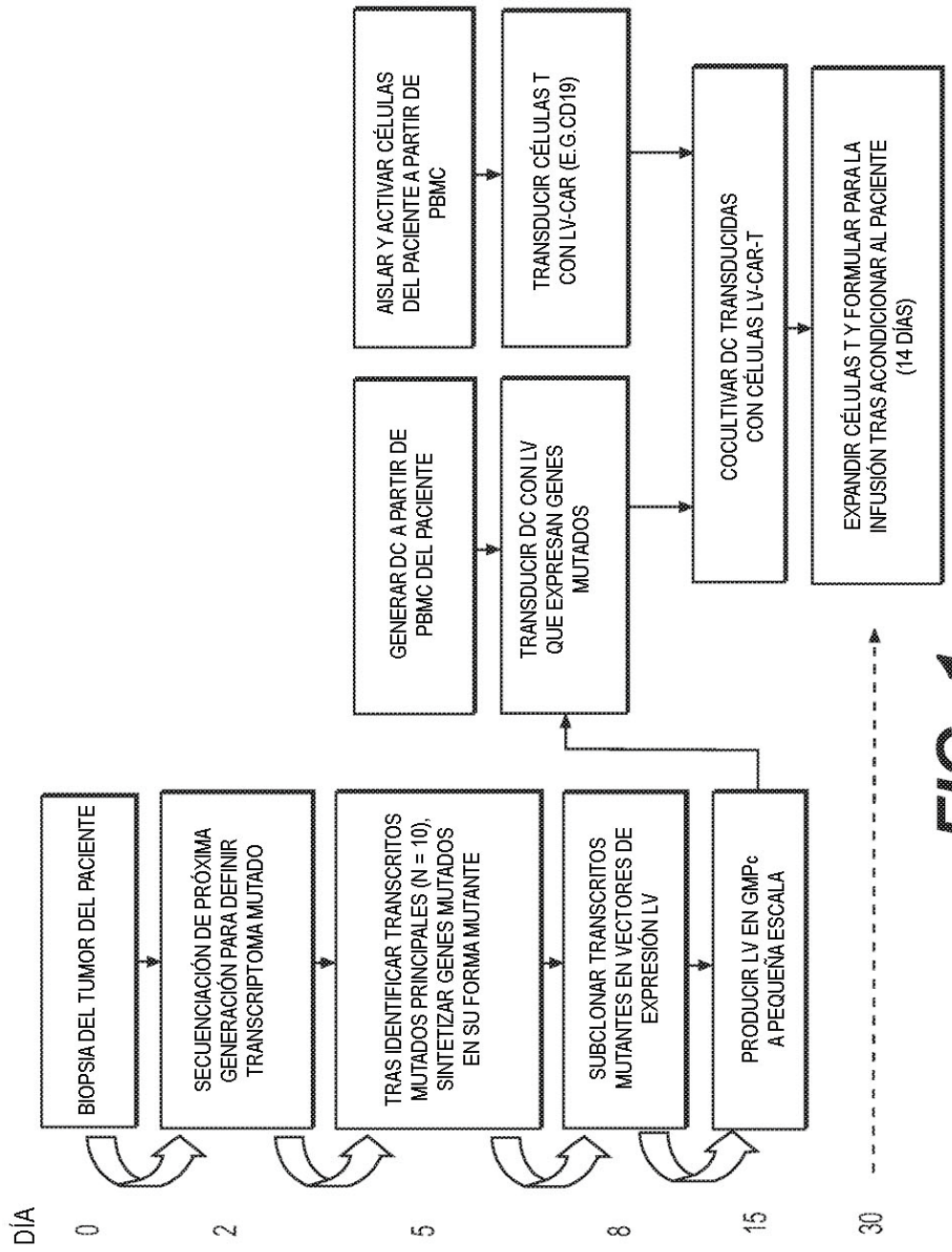

DÍA
0
2
5
8
15
30
BIOPSIA DEL TUMOR DEL PACIENTE
SECUENCIACIÓN DE PRÓXIMA GENERACIÓN PARA DEFINIR TRANSCRIPTOMA MUTADO
TRAS IDENTIFICAR TRANSCRITOS MUTADOS PRINCIPALES (N = 10), SINTETIZAR GENES MUTADOS EN SU FORMA MUTANTE
SUBCLONAR TRANSCRITOS MUTANTES EN VECTORES DE EXPRESIÓN LV
PRODUCIR LV EN GMPc A PEQUEÑA ESCALA
GENERAR DC A PARTIR DE PBMC DEL PACIENTE
TRANSDUCIR DC CON LV QUE EXPRESAN GENES MUTADOS
AISLAR Y ACTIVAR CÉLULAS DEL PACIENTE A PARTIR DE PBMC
TRANSDUCIR CÉLULAS T CON LV-CAR (E.G.CD19)
COCULTIVAR DC TRANSDUCIDAS CON CÉLULAS LV-CAR-T
EXPANDIR CÉLULAS T Y FORMULAR PARA LA INFUSIÓN TRAS ACONDICIONAR AL PACIENTE (14 DÍAS)

FIG. 1

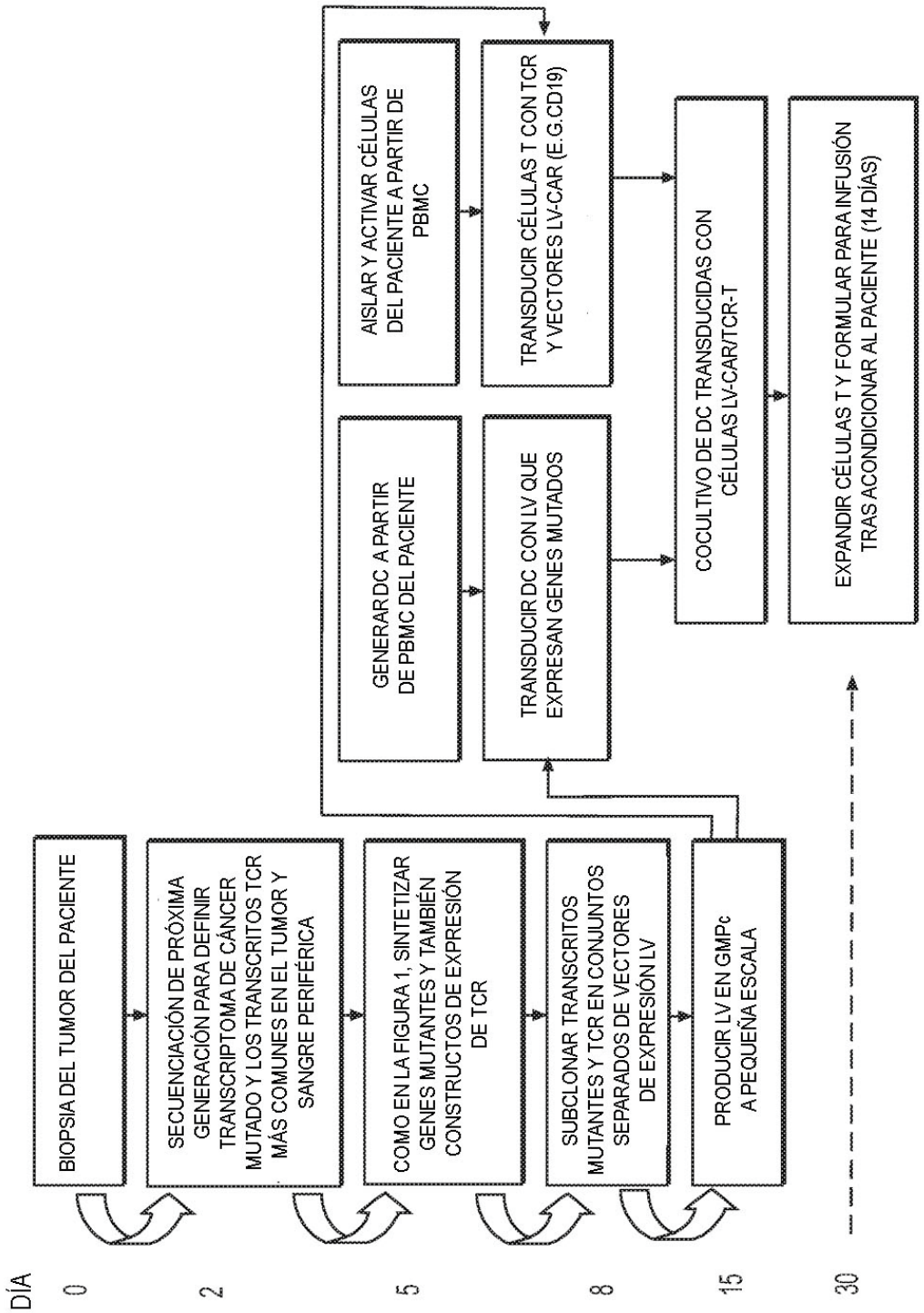

DÍA
0
2
5
8
15
30
BIOPSIA DEL TUMOR DEL PACIENTE
SECUENCIACIÓN DE PRÓXIMA GENERACIÓN PARA DEFINIR TRANSCRIPTOMA DE CÁNCER MUTADO Y LOS TRANSCRITOS TCR MÁS COMUNES EN EL TUMOR Y SANGRE PERIFÉRICA
COMO EN LA FIGURA 1, SINTETIZAR GENES MUTANTES Y TAMBIÉN CONSTRUCTOS DE EXPRESIÓN DE TCR
SUBCLONAR TRANSCRITOS MUTANTES Y TCR EN CONJUNTOS SEPARADOS DE VECTORES DE EXPRESIÓN LV
PRODUCIR LV EN GMPc A PEQUEÑA ESCALA
GENERAR DC A PARTIR DE PBMC DEL PACIENTE
TRANSDUCIR DC CON LV QUE EXPRESAN GENES MUTADOS
AISLAR Y ACTIVAR CÉLULAS DEL PACIENTE A PARTIR DE PBMC
TRANSDUCIR CÉLULAS T CON TCR Y VECTORES LV-CAR (E.G.CD19)
COCULTIVO DE DC TRANSDUCIDAS CON CÉLULAS LV-CAR/TCR-T
EXPANDIR CÉLULAS T Y FORMULAR PARA INFUSIÓN TRAS ACONDICIONAR AL PACIENTE (14 DÍAS)

FIG. 2