

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 027 134**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2020** **PCT/CN2020/136241**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.06.2021** **WO21121193**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2020** **E 20901145 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2025** **EP 4032978**

54 Título: **Receptor de antígeno quimérico dirigido a CD19 y uso del mismo**

30 Prioridad:

17.12.2019 CN 201911301518

16.11.2020 CN 202011274810

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

12.06.2025

73 Titular/es:

JUVENTAS CELL THERAPY LTD. (100.00%)
Building 5, No. 8, Haitai Development 3rd Road,
Huayuan Industrial Zone, Binhai High-tech Zone
Tianjin 300384, CN

72 Inventor/es:

WANG, JIANXIANG;
WANG, MIN;
LV, LULU;
SHI, LIN;
AN, NA;
WANG, RUI y
LIU, YUN

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

Observaciones:

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

ES 3 027 134 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Receptor de antígeno quimérico dirigido a CD19 y uso del mismo

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

[0001] La presente divulgación se refiere al campo de la biomedicina. Más específicamente, la divulgación se refiere a un receptor de antígeno quimérico dirigido a CD19 y uso del mismo.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

[0002] Actualmente, las terapias clínicas para la leucemia linfoblástica aguda (LLA), la leucemia linfocítica crónica (LLC) y el linfoma de células B incluyen principalmente quimioterapia, trasplante de células madre y terapia biológica. Si bien estas terapias pueden alcanzar cierta eficacia, la leucemia recidivante o refractaria sigue siendo un problema importante difícil de abordar. Como nueva estrategia de tratamiento, la inmunoterapia celular tumoral se ha convertido en un tema de gran interés en las investigaciones recientes. El CD19 se expresa ampliamente en la superficie de casi todas las células tumorales de células B, mientras que su expresión es escasa en otras células parenquimatosas y células madre hematopoyéticas.

[0003] Las células tumorales pueden producir un escape inmunitario mediante diversas vías, por ejemplo, la regulación negativa de la expresión de las moléculas que participan en el reconocimiento de células T (linfocitos T) y las respuestas antigénicas, o la reducción de la inmunogenicidad, lo que impide que el sistema inmunitario de un organismo sea incapaz de eliminar eficazmente los tumores. Estudios han demostrado que las células T con receptores de antígenos quiméricos (células CAR-T) pueden reconocer antígenos en la superficie de las células tumorales y destruir específicamente las células tumorales, por lo que son útiles para el tratamiento de tumores.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0004] La presente divulgación da a conocer un receptor de antígeno quimérico que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO. 1. La presente divulgación da a conocer, además, un ácido nucleico que codifica el receptor de antígeno quimérico, un vector que comprende el ácido nucleico, una célula efectora inmunitaria que comprende el receptor de antígeno quimérico, la molécula de ácido nucleico y/o el vector, un procedimiento para preparar la célula efectora inmunitaria, una composición que comprende la célula efectora inmunitaria y el uso del receptor de antígeno quimérico.

[0005] El receptor de antígeno quimérico según la presente divulgación comprende al menos uno de los siguientes efectos ventajosos:

- (1) expresión estable en la superficie de las células inmunitarias (tales como las células T), en niveles elevados de expresión;
- (2) una fuerte capacidad para matar células diana CD19-positivas;
- (3) una capacidad para promover que las células inmunitarias secreten citocinas, por ejemplo, mejorando la capacidad de las células T para secretar citocinas (INF- γ o IL-6) al menos 1, 2 o 3 veces;
- (4) no ser hemolítico y no ser susceptible de inducir hemólisis o agregación de glóbulos rojos;
- (5) estar libre de irritación vascular y no producir anomalías locales o sistémicas después de la administración;
- (6) carecer de potencial oncogénico y no ser oncogénico *in vivo* o *in vitro*;
- (7) una capacidad de prolongar el tiempo de supervivencia de los pacientes con cáncer;
- (8) una capacidad para mejorar eficazmente la gravedad del cáncer (tal como la leucemia linfoblástica aguda en adultos, la leucemia linfoblástica aguda en niños y/o el linfoma no Hodgkin); y
- (9) una capacidad de exhibir una acción de mayor seguridad con un menor riesgo de inducir efectos secundarios (por ejemplo, síndrome de liberación de citocinas o síndrome de encefalopatía relacionada con células CAR-T).

[0006] En un aspecto, la presente divulgación da a conocer un receptor de antígeno quimérico, que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO. 1.

[0007] En otro aspecto, la presente divulgación da a conocer además una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el receptor de antígeno quimérico descrito en este documento.

[0008] En otro aspecto, la presente divulgación da a conocer además una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el receptor de antígeno quimérico, en donde la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico que se muestra en SEQ ID NO. 2.

[0009] En otro aspecto, la presente divulgación da a conocer además un vector que comprende la molécula de ácido nucleico descrita en este documento.

[0010] En otro aspecto, la presente divulgación da a conocer además una célula efectora inmunitaria, que comprende el receptor de antígeno quimérico, la molécula de ácido nucleico y/o el vector descritos en este documento.

[0011] En ciertas realizaciones, la célula efectora inmunitaria se selecciona del grupo que consiste en un linfocito T y una célula asesina natural.

5 [0012] En ciertas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico se expresa en la superficie de la célula efectora inmunitaria.

10 [0013] En otro aspecto, la presente divulgación da a conocer además un procedimiento para preparar una célula efectora inmunitaria, que comprende la etapa de transducir el vector descrito en este documento en una célula efectora inmunitaria.

[0014] En ciertas realizaciones, la célula efectora inmunitaria se selecciona del grupo que consiste en un linfocito T y una célula asesina natural.

15 [0015] En otro aspecto, la presente divulgación da a conocer además una composición que comprende la célula efectora inmunitaria descrita en este documento.

20 [0016] En otro aspecto, la presente divulgación da a conocer además el uso del receptor de antígeno quimérico, la molécula de ácido nucleico, el vector y/o la célula efectora inmunitaria en la fabricación de un medicamento, en donde el medicamento es útil para el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de CD19.

25 [0017] En otro aspecto, la presente divulgación da a conocer además un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de CD19, que comprende aplicar el receptor de antígeno quimérico, la molécula de ácido nucleico, el vector y/o la célula efectora inmunitaria.

[0018] En otro aspecto, la presente divulgación da a conocer además el receptor de antígeno quimérico, la molécula de ácido nucleico, el vector y/o la célula efectora inmunitaria para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de CD19.

30 [0019] En ciertas realizaciones, la enfermedad o trastorno asociado con la expresión de CD19 comprende tumores no sólidos.

[0020] En ciertas realizaciones, el tumor no sólido comprende leucemia y/o linfoma.

35 [0021] En ciertas realizaciones, la enfermedad o trastorno asociado con la expresión de CD19 comprende leucemia linfoblástica aguda y/o linfoma de células B.

40 [0022] En ciertas realizaciones, la leucemia linfoblástica aguda comprende leucemia linfoblástica aguda en adultos y/o leucemia linfoblástica aguda en niños.

[0023] En ciertas realizaciones, el medicamento para tratar la leucemia linfoblástica aguda se administra en una dosis de $0,25 \times 10^8$ a $0,5 \times 10^8$ células T CAR positivas.

45 [0024] En ciertas realizaciones, el linfoma de células B comprende el linfoma no Hodgkin.

[0025] En ciertas realizaciones, el medicamento para tratar el linfoma no Hodgkin se administra en una dosis de 1×10^8 a 2×10^8 células T CAR positivas.

50 [0026] Los expertos en la materia pueden entender fácilmente otros aspectos y ventajas de la presente divulgación a partir de la descripción detallada que se presenta a continuación. En la siguiente descripción detallada, solo se muestran y describen realizaciones de ejemplo de la presente divulgación. Tal como comprenderán los expertos en la materia, el contenido de esta divulgación permite a los expertos en la materia realizar modificaciones en las realizaciones específicas descritas en el presente documento sin apartarse del espíritu inventivo ni del alcance de la divulgación. Por consiguiente, los dibujos e ilustraciones en la descripción de la presente divulgación son solo a modo de ejemplo, no limitativos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

60 [0027] Las características específicas implicadas en esta divulgación se muestran en las reivindicaciones adjuntas. A continuación, se presenta una breve descripción de los dibujos:

Las Figuras 1A y 1B muestran los resultados de detección de moléculas CAR expresadas en la superficie de las células CNCT19.

La Figura 2 muestra tasas residuales de células tumorales en diferentes condiciones de cocultivo.

65 La Figura 3 muestra la muerte de células diana (CHO-CD19) por células CNCT19 tal como se monitoriza en tiempo real por el sistema de análisis de células en tiempo real (RTCA) de doble propósito (DP).

La Figura 4A muestra variaciones de las concentraciones de INF- γ en el sobrenadante bajo diferentes condiciones de

co-cultivo.

La Figura 4B muestra variaciones de las concentraciones de IL-6 en el sobrenadante bajo diferentes condiciones de co-cultivo.

La Figura 5A muestra los resultados de la observación de cada tubo de ensayo antes de agitarlo durante 3 horas.

5 La Figura 5B muestra los resultados de la observación de cada tubo de ensayo después de agitarlo durante 3 horas. La Figura 6A muestra una micrografía del sitio inyectado localmente después de la administración de las células CAR-T (tinción con HE, lente objetivo de 10 ×).

La Figura 6B muestra una micrografía del sitio inyectado localmente después de la administración de una solución inyectable de cloruro de sodio (tinción con HE, lente objetivo de 10 ×).

10 La Figura 7 muestra la formación de colonias en agar blando después de 3 semanas de inoculación de células en cada grupo.

La Figura 8 muestra curvas de supervivencia de ratones NCG con tumores de xenoinjerto Nalm-6 tratados con diferentes células.

La Figura 9 muestra la distribución de los tejidos después de la administración única de células CNCT19.

15 La Figura 10 es una comparación de las células CNCT19 distribuidas *in vivo* en animales portadores de tumores y no portadores de tumores.

La Figura 11 muestra variaciones de las células CNCT19 distribuidas en varios tejidos de los animales después de una administración única.

20 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

[0028] Los siguientes ejemplos específicos ilustran las realizaciones particulares de la presente divulgación. Quienes estén familiarizados con esta tecnología comprenderán fácilmente las demás ventajas y efectos de la divulgación a partir del contenido aquí descrito.

25 [0029] A continuación, se describe la divulgación con más detalle: de acuerdo con la presente divulgación, salvo que se especifique lo contrario, los términos científicos y técnicos utilizados en el presente documento tienen el significado común para los expertos en la materia. Además, los términos y procedimientos de laboratorio relacionados de la química de proteínas y ácidos nucleicos, la biología molecular, el cultivo celular y tisular, la microbiología y la
30 inmunología utilizados en el presente documento son términos y procedimientos rutinarios de uso generalizado en los campos correspondientes. Para una mejor comprensión de la presente divulgación, a continuación se proporcionan las definiciones y explicaciones de los términos relacionados.

[0030] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "Receptor de Antígeno Quimérico " (CAR) se refiere generalmente a una proteína fusionada que comprende un dominio extracelular capaz de unirse a un antígeno y al
35 menos un dominio intracelular. El CAR es un componente esencial de las células T con receptor de antígeno quimérico (CAR-T), que puede incluir un resto de reconocimiento (por ejemplo, un resto que se une a un antígeno asociado a tumores [TAA, *tumor associated antigen*]), una región bisagra, una región transmembrana y un dominio intracelular. En la presente divulgación, el CAR puede combinarse con el dominio intracelular para la activación del receptor de
40 células T en base a la especificidad antigénica de un anticuerpo. Las células T que expresan el CAR pueden reconocer y eliminar específicamente las células malignas que expresan el antígeno diana.

[0031] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aislado" se refiere generalmente a la obtención por medios artificiales a partir del estado natural. Si una sustancia o componente "aislado" aparece en la naturaleza, podría
45 significar que el entorno natural en el que se encuentra ha sido modificado, o que la sustancia ha sido aislada del entorno natural, o ambas cosas. Por ejemplo, cierto polinucleótido o polipéptido no aislado se encuentra de forma natural en un animal vivo, y el mismo polinucleótido o polipéptido, de alta pureza y aislado de este estado natural, se denomina aislado. El término "aislado" no excluye la posibilidad de que esté mezclado con una sustancia artificial o sintética, ni excluye la presencia de otras impurezas que no afecten a la actividad de la sustancia.

50 [0032] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "célula efectora inmunitaria" se refiere en general a las células que participan en una respuesta inmunitaria, tal como las que promueven una respuesta efectora inmunitaria. En la presente divulgación, la célula efectora inmunitaria puede seleccionarse del grupo que consiste en células T y células asesinas naturales.

55 [0033] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "se une específicamente y/o reconoce específicamente" se refiere en general a una interacción que es medible y reproducible, tal como la unión entre una diana y un anticuerpo (o fragmento estructural de CAR), que puede determinar la presencia de una diana cuando existe una población celular heterogénea de una molécula (incluida una biomolécula). Por ejemplo, un anticuerpo (o
60 fragmento estructural de CAR) que se une específicamente a una diana (que puede ser un epítipo) es el anticuerpo (o fragmento estructural de CAR) que se une a la diana con mayor afinidad y avidez, con mayor facilidad y/o durante un período más prolongado, en comparación con su unión a otras dianas.

[0034] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "molécula de ácido nucleico aislada" se refiere en
65 general a un nucleótido, desoxirribonucleótido o ribonucleótido de cualquier longitud en su forma aislada, o un análogo que ha sido aislado de su entorno natural o sintetizado artificialmente.

[0035] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "vector" se refiere en general a una herramienta para suministrar ácido nucleico en el que se puede insertar un polinucleótido que codifica una determinada proteína y mediante el cual se puede expresar la proteína. El vector puede transformarse, transducirse o transfectarse en la célula huésped para que el elemento de material genético que porta se pueda expresar en la célula huésped. Por ejemplo, los vectores incluyen un plásmido; un fagémido; un cósmido; un cromosoma artificial (tal como el cromosoma artificial de levadura [YAC], un cromosoma artificial bacteriano [BAC] o un cromosoma artificial derivado de P1 [PAC]); un fago, tal como el fago λ o el fago M13, y un virus animal, etc. Los tipos de virus animales que se utilizan como vector incluyen retrovirus (incluidos los lentivirus), adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes (tal como el virus del herpes simple), virus de la viruela, baculovirus, virus del papiloma y virus de la vacuola del papiloma (tal como el SV40). Un vector puede contener diversos elementos que controlan la expresión, incluyendo secuencias promotoras, secuencias de iniciación de la transcripción, secuencias potenciadoras, elementos selectivos y genes reporteros. Además, el vector también puede contener un origen de replicación. El vector también puede incluir componentes que facilitan su entrada en las células, tales como partículas virales, liposomas o cubiertas proteicas, pero no se limitan a estas sustancias.

[0036] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "composición" se refiere en general a una composición adecuada para su administración a un paciente. Por ejemplo, la composición, según la presente divulgación, puede comprender las células efectoras inmunitarias descritas en el presente documento. Además, la composición también puede comprender una o más formulaciones adecuadas de portadores, estabilizantes, excipientes, diluyentes, solubilizantes, surfactantes, emulsionantes y/o conservantes (farmacéuticamente eficaces). Los ingredientes aceptables de la composición son no tóxicos para el paciente en cualquier dosis y concentración utilizada. Las composiciones de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, líquidos y composiciones congeladas o liofilizadas.

[0037] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "CD19" suele referirse a las proteínas del grupo de diferenciación (CD) 19, que es el grupo de determinantes antigénicos que se pueden detectar en las células precursoras de leucemia. Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos del CD19 humano y murino se pueden encontrar en bases de datos públicas (tales como GenBank, UniProt y Swiss-Prot). Por ejemplo, a la secuencia de aminoácidos del CD19 humano se puede acceder con el número de acceso P15391 de UniProt/Swiss-Prot, y a la secuencia de nucleótidos que codifica el CD19 humano se puede acceder con el número de acceso NM_001178098. Según la presente divulgación, "CD19" puede incluir proteínas con mutaciones (por ejemplo, mutaciones puntuales, fragmentos, inserciones, deleciones y variantes de empalme del CD19 de tipo salvaje de longitud completa).

[0038] Tal como se utiliza en este documento, el término "sujeto" generalmente se refiere a un animal humano o no humano, incluyendo, pero sin limitación, gato, perro, caballo, cerdo, vaca, oveja, conejo, ratón, rata o mono.

[0039] Tal como se utiliza en este documento, el término "que comprende" generalmente se refiere a la inclusión de características explícitamente especificadas, pero sin excluir otros elementos.

[0040] Tal como se utiliza en este documento, el término "aproximadamente" generalmente se refiere a variar dentro de un intervalo de 0,5 %-10 % mayor o menor que el valor establecido, tal como variar dentro de un intervalo de 0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 %, 5 %, 5,5 %, 6 %, 6,5 %, 7 %, 7,5 %, 8 %, 8,5 %, 9 %, 9,5 % o 10 % mayor o menor que el valor establecido.

Receptor de antígeno quimérico, ácido nucleico, vector, célula efectora inmunitaria y composición

[0041] En un aspecto, la presente divulgación da a conocer un receptor de antígeno quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 1. La presente divulgación da a conocer además, pero no reivindica, un receptor de antígeno quimérico que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 80 % (tal como, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 1.

[0042] En ciertas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico descrito en este documento puede unirse específicamente a antígenos tumorales y/o reconocerlos. Por ejemplo, el receptor de antígeno quimérico descrito en este documento puede unirse específicamente al antígeno CD19 y/o reconocerlo.

[0043] En ciertas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico descrito en este documento puede promover que una célula efectora inmunitaria secrete citocinas. La célula efectora inmunitaria puede seleccionarse del grupo que consiste en linfocitos T y células asesinas naturales. La citocina puede seleccionarse del grupo que consiste en IFN- γ e IL-6. La célula efectora inmunitaria puede ser una célula efectora inmunitaria de mamífero. El linfocito T puede ser un linfocito T de mamífero, y la célula asesina natural también puede ser una célula asesina natural de mamífero. El linfocito T puede ser un linfocito T humano, y la célula asesina natural también puede ser una célula asesina natural humana.

[0044] En ciertas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico descrito en este documento no es hemolítico y no produce irritación vascular.

[0045] En ciertas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico descrito en este documento no es oncogénico *in vitro*. En ciertas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico descrito en este documento no es oncogénico *in vivo*. En ciertas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico descrito en este documento puede tratar eficazmente tumores. El tumor puede ser un tumor CD19-positivo. Por ejemplo, el receptor de antígeno quimérico descrito en este documento puede prolongar eficazmente el tiempo de supervivencia de pacientes con tumores CD19-positivos. Por ejemplo, el receptor de antígeno quimérico descrito en este documento puede prolongar eficazmente el tiempo de supervivencia de pacientes con tumores no sólidos. Por ejemplo, el receptor de antígeno quimérico descrito en este documento puede prolongar eficazmente el tiempo de supervivencia del linfoma y/o la leucemia. Para otro ejemplo, el receptor de antígeno quimérico descrito en este documento puede prolongar eficazmente el tiempo de supervivencia de pacientes adultos con leucemia linfoblástica aguda. Para otro ejemplo, el receptor de antígeno quimérico descrito en este documento puede prolongar eficazmente el tiempo de supervivencia de pacientes niños con leucemia linfoblástica aguda. Para otro ejemplo, el receptor de antígeno quimérico descrito en este documento puede prolongar eficazmente el tiempo de supervivencia de pacientes con linfoma de células B (por ejemplo, linfoma no Hodgkin).

[0046] En ciertas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico descrito en este documento puede tratar eficazmente la leucemia linfoblástica aguda en adultos.

[0047] En ciertas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico descrito en este documento puede tratar eficazmente la leucemia linfoblástica aguda en niños.

[0048] En ciertas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico descrito en este documento puede tratar eficazmente el linfoma no Hodgkin.

[0049] En otro aspecto, la presente divulgación da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el receptor de antígeno quimérico descrito en este documento.

[0050] En otro aspecto, la presente divulgación da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el receptor de antígeno quimérico, que comprende la secuencia de ácido nucleico que se muestra en SEQ ID NO. 2.

[0051] En otro aspecto, la presente divulgación da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el receptor de antígeno quimérico, que comprende una secuencia de ácido nucleico análoga a la secuencia mostrada en SEQ ID NO.2 y es una molécula de ácido nucleico que codifica el receptor de antígeno quimérico.

[0052] En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico análoga a la secuencia mostrada en SEQ ID NO.2 se refiere a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO. 2.

[0053] En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico análoga a la secuencia mostrada en SEQ ID NO.2 significa que la molécula de ácido nucleico puede codificar el receptor de antígeno quimérico, aunque es diferente de la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO. 2 debido a la variación (degeneración) de la base en la posición 3 del codón de ácido nucleico.

[0054] La presente divulgación incluye variantes de genes y proteínas (por ejemplo, variantes de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 1, o variantes de la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en la SEQ ID NO. 2, tal como se describe en el presente documento), que conservan una o más actividades biológicas. Dichas variantes de la proteína o polipéptido incluyen una proteína o polipéptido que ha sido modificado o puede ser modificado mediante tecnología de ADN recombinante, de modo que la proteína o polipéptido presente propiedades alteradas o adicionales; por ejemplo, la variante confiere mayor estabilidad plasmática o mayor actividad a la proteína. La variante puede ser diferente de la secuencia de referencia, por ejemplo, diferente de un polinucleótido, proteína o péptido natural. A nivel de secuencia de nucleótidos, el gen variante natural y el gen variante no natural tendrán típicamente al menos aproximadamente un 50 %, más típicamente al menos aproximadamente un 70 %, e incluso más típicamente al menos aproximadamente un 80 % (90 % o más) de identidad con el gen de referencia. A nivel de secuencia de aminoácidos, la proteína variante natural y la proteína variante no natural tendrán típicamente al menos aproximadamente un 70 %, más típicamente al menos aproximadamente un 80 %, e incluso más típicamente al menos aproximadamente un 90 % o más de identidad con la proteína de referencia, permitiendo a la vez regiones de no identidad de porcentaje más alto en regiones no conservadas (por ejemplo, siendo el porcentaje de identidad menor del 70 %, tal como menor del 60 %, menor del 50 %, o incluso menor del 40 %). En otras realizaciones, la secuencia tiene al menos un 60 %, 70 %, 75 % o más de identidad (p. ej., 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad) con la secuencia de referencia. Los procedimientos para introducir la modificación de un nucleótido y un aminoácido en un polinucleótido, proteína o polipéptido han sido conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989)).

[0055] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "identidad", "homología" y sus variantes gramaticales

significan en general que dos o más entidades son idénticas cuando sus secuencias están "alineadas". Así, por ejemplo, cuando dos polipéptidos tienen secuencias idénticas, tienen la misma secuencia de aminoácidos al menos en las regiones o partes de referencia. Si dos polinucleótidos tienen secuencias idénticas, tienen la misma secuencia de polinucleótidos al menos en las regiones o partes de referencia. La identidad puede ser la identidad de las zonas definidas (regiones o dominios) de las secuencias. Las "zonas" o "regiones" de identidad se refieren a las mismas partes de dos o más entidades de referencia. Por lo tanto, si dos proteínas o secuencias de ácidos nucleicos son iguales en una o más zonas o regiones de secuencia, tienen identidad en esa región. Las secuencias "alineadas" se refieren a más secuencias de polinucleótidos o proteínas (aminoácidos), que a menudo contienen bases o aminoácidos suplementarios o adicionales (huecos) en comparación con la secuencia de referencia. El grado de identidad (homología) entre dos secuencias se puede determinar mediante programas informáticos y algoritmos matemáticos. Estos algoritmos, que calculan el porcentaje de identidad de secuencia (homología), calcula en general los huecos y desajustes de secuencia en las regiones o zonas comparadas. Por ejemplo, el algoritmo de búsqueda BLAST (por ejemplo, BLAST 2.0) (véase, por ejemplo, Altschul et al., J.Mol. Biol. 215: 403 (1990), disponible públicamente en NCBI) proporciona los siguientes parámetros de búsqueda de ejemplo: Desajuste -2, apertura de espacio 5, extensión de espacio 2.

[0056] De acuerdo con la presente divulgación, la molécula de ácido nucleico puede ser un nucleótido, desoxirribonucleótido o ribonucleótido de cualquier longitud en su forma aislada, o un análogo que ha sido aislado de su entorno natural o sintetizado artificialmente, siempre que sea capaz de codificar el receptor de antígeno quimérico descrito en este documento.

[0057] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un vector, que comprende la molécula de ácido nucleico descrita en este documento.

[0058] Según la presente divulgación, el vector puede transformarse, transducirse o transfectarse en la célula huésped para que el material genético que transporta pueda expresarse en la célula huésped. Por ejemplo, los vectores pueden incluir un plásmido; un fagémido; un cósmido; un cromosoma artificial (tal como el cromosoma artificial de levadura [YAC], el cromosoma artificial bacteriano [BAC] o el cromosoma artificial derivado de P1 [PAC]); un fago tal como el fago λ o el fago M13, y un virus animal, etc. Los tipos de virus animales que se utilizan como vector incluyen retrovirus (incluidos lentivirus), adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes (tal como el virus del herpes simple), virus de la viruela, baculovirus, virus del papiloma y virus de la vacuola del papiloma (tal como el SV40). Para otro ejemplo, el vector puede contener una variedad de elementos que controlan la expresión, que incluyen secuencias promotoras, secuencias de iniciación de la transcripción, secuencias potenciadoras, elementos selectivos y genes reporteros. Además, el vector puede contener también un origen de replicación. Además, el vector puede incluir también componentes que facilitan su entrada en las células, tales como partículas virales, liposomas o cubiertas proteicas, pero no se limitan a estas sustancias.

[0059] En otro aspecto, la presente divulgación da a conocer una célula efectora inmunitaria, que comprende el receptor de antígeno quimérico, la molécula de ácido nucleico y/o el vector descrito en este documento.

[0060] Según la presente divulgación, la célula efectora inmunitaria puede seleccionarse del grupo que consiste en linfocitos T y células asesinas naturales. En ciertas realizaciones, la célula efectora inmunitaria puede ser una célula efectora inmunitaria humana. Por ejemplo, la célula efectora inmunitaria puede ser un linfocito T humano. En otro ejemplo, la célula efectora inmunitaria puede ser una célula asesina natural humana.

[0061] De acuerdo con la presente divulgación, el receptor de antígeno quimérico descrito en este documento se expresa en la superficie de la célula efectora inmunitaria.

[0062] En ciertas realizaciones, la célula efectora inmunitaria descrita en este documento puede destruir eficazmente células tumorales. Las células tumorales pueden ser células CD19-positivas. Por ejemplo, la célula efectora inmunitaria descrita en este documento puede reducir considerablemente la tasa residual de células Nalm-6 de la línea celular de leucemia humana CD19-positivas.

[0063] En ciertas realizaciones, la célula efectora inmunitaria descrita en este documento puede promover eficazmente la secreción de citocinas al entrar en contacto con células CD19-positivas. La citocina puede seleccionarse del grupo que consiste en IFN- γ e IL-6. Por ejemplo, el cocultivo de la célula efectora inmunitaria descrita en este documento con células Nalm-6 de la línea celular de leucemia humana CD19-positivas produce un aumento significativo en la secreción de las citocinas IFN- γ e IL-6.

[0064] En ciertas realizaciones, la célula efectora inmunitaria descrita en este documento no es hemolítica ni produce irritación vascular. Por ejemplo, en una prueba de hemólisis *in vitro*, la célula efectora inmunitaria descrita en este documento no induciría hemólisis ni agregación sanguínea. Para otro ejemplo, la célula efectora inmunitaria descrita en este documento no produce irritación vascular.

[0065] En ciertas realizaciones, la célula efectora inmunitaria descrita en este documento no es oncogénica *in vitro*.

[0066] En ciertas realizaciones, la célula efectora inmunitaria descrita en este documento no es oncogénica *in vivo*.

[0067] En ciertas realizaciones, la célula efectora inmunitaria descrita en este documento puede tratar eficazmente tumores. El tumor puede ser un tumor CD19-positivo. Por ejemplo, la célula efectora inmunitaria descrita en este documento puede prolongar eficazmente el tiempo de supervivencia de pacientes con tumores CD19-positivos. Para otro ejemplo, la célula efectora inmunitaria descrita en este documento puede prolongar eficazmente el tiempo de supervivencia de pacientes adultos con leucemia linfoblástica aguda. Para otro ejemplo, la célula efectora inmunitaria descrita en este documento puede prolongar eficazmente el tiempo de supervivencia de pacientes niños con leucemia linfoblástica aguda. Para otro ejemplo, la célula efectora inmunitaria descrita en este documento puede prolongar eficazmente el tiempo de supervivencia de pacientes con linfoma de células B (tal como el linfoma no Hodgkin).

[0068] En ciertas realizaciones, la célula efectora inmunitaria descrita en este documento puede tratar eficazmente la leucemia linfoblástica aguda en adultos.

[0069] En ciertas realizaciones, la célula efectora inmunitaria descrita en este documento puede tratar eficazmente la leucemia linfoblástica aguda en niños.

[0070] En ciertas realizaciones, la célula efectora inmunitaria descrita en este documento puede tratar eficazmente el linfoma de células B (tal como el linfoma no Hodgkin).

[0071] En otro aspecto, la presente divulgación da a conocer una composición que comprende la célula efectora inmunitaria descrita en este documento.

[0072] Según la presente divulgación, la composición también puede comprender una o más formulaciones adecuadas de portadores, estabilizantes, excipientes, diluyentes, solubilizantes, surfactantes, emulsionantes y/o conservantes (farmacéuticamente eficaces). Los ingredientes aceptables de la composición son no tóxicos para el receptor en cualquier dosis y concentración utilizada. Las composiciones de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, líquidos y composiciones congeladas o liofilizadas.

[0073] En ciertas realizaciones, la composición puede ser una composición para administración por vía parenteral, transdérmica, intraluminal, intraarterial, intratecal y/o intranasal, o por inyección directa en el tejido. Por ejemplo, la composición puede administrarse a un paciente o sujeto mediante infusión o inyección. En otras realizaciones, la administración de la composición puede realizarse por diferentes vías, por ejemplo, por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. En otras realizaciones, la composición puede administrarse de forma ininterrumpida. La administración ininterrumpida (o continua) puede realizarse mediante un pequeño sistema de bomba que el paciente lleva puesto para dosificar la entrada del agente terapéutico en su cuerpo, tal como se describe en el documento WO2015/036583.

[0074] Según la presente divulgación, el régimen de dosificación de la composición puede ser una dosis de un agente de infusión rápida; múltiples dosis divididas administradas a lo largo del tiempo; o bien, las dosis pueden disminuirse o aumentarse proporcionalmente a la gravedad y urgencia de la situación de tratamiento. En ciertas realizaciones, el régimen de tratamiento puede administrarse una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada tres meses o una vez cada tres a seis meses. En ciertas realizaciones, el régimen de dosificación incluye administración intravenosa, y la dosis puede administrarse en un intervalo de $0,1 \times 10^8$ a 3×10^8 células T CAR-positivas, por ejemplo, de $0,15 \times 10^8$ a 2×10^8 células T CAR-positivas, de $0,5 \times 10^8$ a 2×10^8 células T CAR-positivas, de 1×10^8 a 2×10^8 células T CAR-positivas, de $0,2 \times 10^8$ a 2×10^8 células T CAR-positivas, de $0,2 \times 10^8$ a 1×10^8 células T CAR-positivas, de $0,25 \times 10^8$ a 1×10^8 células T CAR-positivas, de $0,25 \times 10^8$ a $0,5 \times 10^8$ células T CAR-positivas, o $0,5 \times 10^8$ células T CAR positivas, o 2×10^8 células T CAR positivas.

[0075] Las dosis de administración pueden variar según las diferentes indicaciones. En ciertas realizaciones, la célula efectora inmunitaria para el tratamiento de pacientes adultos con leucemia linfoblástica aguda recidivante y refractaria puede administrarse en una dosis de $0,25 \times 10^8$ a $0,5 \times 10^8$ de células T CAR-positivas, o $0,5 \times 10^8$ de células T CAR-positivas, por ejemplo, de $0,3 \times 10^8$ a $0,5 \times 10^8$, de $0,4 \times 10^8$ a $0,5 \times 10^8$, de $0,25 \times 10^8$ a $0,4 \times 10^8$, de $0,3 \times 10^8$ a $0,4 \times 10^8$, o de $0,4 \times 10^8$ a $0,5 \times 10^8$ de células T CAR-positivas. En ciertas realizaciones, la célula efectora inmunitaria para el tratamiento de pacientes adultos con leucemia linfoblástica aguda recidivante y refractaria se puede administrar a una dosis de $0,25 \times 10^8$, $0,26 \times 10^8$, $0,27 \times 10^8$, $0,28 \times 10^8$, $0,29 \times 10^8$, $0,3 \times 10^8$, $0,31 \times 10^8$, $0,32 \times 10^8$, $0,33 \times 10^8$, $0,34 \times 10^8$, $0,35 \times 10^8$, $0,36 \times 10^8$, $0,37 \times 10^8$, $0,38 \times 10^8$, $0,39 \times 10^8$, $0,4 \times 10^8$, $0,41 \times 10^8$, $0,42 \times 10^8$, $0,43 \times 10^8$, $0,44 \times 10^8$, $0,45 \times 10^8$, $0,46 \times 10^8$, $0,47 \times 10^8$, $0,48 \times 10^8$, $0,49 \times 10^8$ o $0,5 \times 10^8$ células T CAR-positivas.

[0076] En ciertas realizaciones, la célula efectora inmunitaria para el tratamiento de pacientes niños con leucemia linfoblástica aguda recidivante y refractaria se puede administrar en una dosis de $0,25 \times 10^8$ a $0,5 \times 10^8$ células T CAR-positivas, o $0,5 \times 10^8$ células T CAR-positivas, por ejemplo, de $0,3 \times 10^8$ a $0,5 \times 10^8$, de $0,4 \times 10^8$ a $0,5 \times 10^8$, de $0,25 \times 10^8$ a $0,4 \times 10^8$, de $0,3 \times 10^8$ a $0,4 \times 10^8$ o de $0,4 \times 10^8$ a $0,5 \times 10^8$ células T CAR-positivas. En algunas realizaciones, la célula efectora inmunitaria para el tratamiento de pacientes niños con leucemia linfoblástica aguda recidivante y

refractoria se puede administrar en una dosis de $0,25 \times 10^8$, $0,26 \times 10^8$, $0,27 \times 10^8$, $0,28 \times 10^8$, $0,29 \times 10^8$, $0,3 \times 10^8$, $0,31 \times 10^8$, $0,32 \times 10^8$, $0,33 \times 10^8$, $0,34 \times 10^8$, $0,35 \times 10^8$, $0,36 \times 10^8$, $0,37 \times 10^8$, $0,38 \times 10^8$, $0,39 \times 10^8$, $0,4 \times 10^8$, $0,41 \times 10^8$, $0,42 \times 10^8$, $0,43 \times 10^8$, $0,44 \times 10^8$, $0,45 \times 10^8$, $0,46 \times 10^8$, $0,47 \times 10^8$, $0,48 \times 10^8$, $0,49 \times 10^8$ o $0,5 \times 10^8$ células T CAR positivas.

- 5 [0077] En otras realizaciones, la célula efectora inmunitaria para el tratamiento de pacientes con linfoma no Hodgkin recidivante y refractario se puede administrar a una dosis de 1×10^8 a 2×10^8 células T CAR-positivas, o 2×10^8 células T CAR-positivas, por ejemplo, de 1×10^8 a $1,8 \times 10^8$, de 1×10^8 a $1,5 \times 10^8$, de 1×10^8 a $1,3 \times 10^8$, de $1,3 \times 10^8$ a 2×10^8 , de $1,3 \times 10^8$ a $1,5 \times 10^8$, de $1,5 \times 10^8$ a 2×10^8 , de $1,5 \times 10^8$ a $1,8 \times 10^8$ o de $1,8 \times 10^8$ a 2×10^8 células T CAR-positivas. En otras realizaciones, la célula efectora inmunitaria para el tratamiento de pacientes con linfoma de Hodgkin recidivante y refractario puede administrarse en una dosis de 1×10^8 , $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$ o $2,0 \times 10^8$ células T CAR-positivas.

Procedimiento de preparación y uso

- 15 [0078] En otro aspecto, la presente divulgación da a conocer además un procedimiento para preparar una célula efectora inmunitaria, que comprende la etapa de transducir el vector descrito en este documento en la célula efectora inmunitaria.

- 20 [0079] En ciertas realizaciones, la célula efectora inmunitaria se selecciona del grupo que consiste en linfocitos T y células asesinas naturales.

- 25 [0080] En otro aspecto, la presente divulgación da a conocer además el uso del receptor de antígeno quimérico, la molécula de ácido nucleico, el vector y/o la célula efectora inmunitaria en la fabricación de un medicamento, donde el medicamento es útil para el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de CD19. Las dosis de administración del medicamento pueden referirse a las definidas para la célula efectora inmunitaria, tal como se mencionó anteriormente.

- 30 [0081] En otro aspecto, la presente divulgación da a conocer además un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de CD19, que comprende la aplicación del receptor de antígeno quimérico, la molécula de ácido nucleico, el vector y/o la célula efectora inmunitaria descritos en este documento a un sujeto que lo necesite. Según la presente divulgación, la composición puede administrarse por diferentes vías, por ejemplo, intravenosa, intratumoral, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica.

- 35 [0082] En otro aspecto, el receptor de antígeno quimérico, la molécula de ácido nucleico, el vector y/o la célula efectora inmunitaria descritos en este documento son útiles para el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de CD19.

[0083] Según la presente divulgación, el medicamento puede incluir agentes de inmunoterapia de células T.

- 40 [0084] Según la presente divulgación, la enfermedad o trastorno asociado con la expresión de CD19 puede incluir tumores no sólidos.

- 45 [0085] Según la presente divulgación, la enfermedad o trastorno asociado con la expresión de CD19 puede incluir leucemia y/o linfoma.

- [0086] En ciertas realizaciones, la enfermedad o trastorno asociado con la expresión de CD19 puede comprender leucemia linfoblástica aguda (LLA), tal como leucemia linfoblástica aguda (LLA) en adultos y/o leucemia linfoblástica aguda (LLA) infantil.

- 50 [0087] En otras realizaciones, la enfermedad o trastorno asociado con la expresión de CD19 puede comprender la leucemia linfocítica crónica (LLC) en adultos. En otras realizaciones, la enfermedad o trastorno asociado con la expresión de CD19 puede comprender el linfoma de células B. Por ejemplo, el linfoma de células B puede comprender el linfoma no Hodgkin.

- 55 [0088] Según la presente divulgación, el sujeto puede comprender un animal humano o no humano. Por ejemplo, el sujeto puede incluir, pero sin limitación, un gato, un perro, un caballo, un cerdo, una vaca, una oveja, un conejo, un ratón, una rata o un mono.

- 60 [0089] Sin desear limitarse a ninguna teoría, los siguientes ejemplos se describen únicamente para ilustrar el receptor de antígeno quimérico, la célula efectora inmunitaria, el procedimiento de preparación y el uso de la presente divulgación, y no se utilizan para limitar su alcance. Los ejemplos no incluyen descripciones detalladas de procedimientos tradicionales, tales como los utilizados para construir vectores y plásmidos, procedimientos de inserción de genes que codifican proteínas en dichos vectores y plásmidos, ni procedimientos de introducción de plásmidos en células huésped. Dichos procedimientos son bien conocidos por los expertos en la materia y se describen en numerosas publicaciones, incluyendo Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2.^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Ejemplos

Ejemplo 1. Construcción de un vector lentiviral

[0090] Se sintetizó artificialmente un fragmento que contenía la estructura CAR descrita en la presente divulgación (su secuencia de aminoácidos y su secuencia de nucleótidos se muestran en las SEQ ID N.º 1 y SEQ ID N.º 2, respectivamente) y se construyó en un vector lentiviral (fabricante: SBI Corporation, número de catálogo: CD500-CD800). El vector de expresión obtenido se denominó vector de expresión CNCT19 y, a continuación, se transfectó según el procedimiento descrito en sus instrucciones para obtener un lentivirus. El título de transfección del virus se midió mediante citometría de flujo y se confirmó la obtención de un vector lentiviral funcional.

Ejemplo 2. Preparación de células T infectadas con vector lentiviral

[0091] El experimento de infección se llevó a cabo según procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Las etapas de la infección se describen brevemente a continuación:

1. Clasificación de células T

[0092] Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de las células de aféresis del sujeto y a continuación se clasificaron las células T de las células PBMC.

2. Activación de las células T

[0093] Las células T aisladas se resuspendieron con medio de cultivo linfocitario completo (medio Xvivo15 + 5 % de SFB + 100 UI/ml de IL-2 o medio Xvivo15 + 5 % de SFB + 20 ng/ml de IL-21 + 10 ng/ml de IL-7) para obtener una concentración final de $(1-2) \times 10^6$ células/ml, y se añadieron de 5 a 10 μ l de microesferas magnéticas de estimulación CD3/CD28. La mezcla se mezcló bien y se colocó en una incubadora para su cultivo durante al menos 24 horas en condiciones de cultivo de 37 °C + 5 % de CO₂.

3. Infección de células T con lentivirus

[0094] Se extrajeron las células T cultivadas activadas y se añadió polibreno a una concentración final de 8 μ g/ml y se mezclaron bien. El vector lentiviral se añadió lentamente a MOI = 2. Tras mezclar bien, la mezcla se colocó en una centrífuga y se centrifugó a 1500 rpm durante 1,5 horas. Posteriormente, se colocó en una incubadora para su cultivo durante al menos 24 horas en condiciones de cultivo de 37 °C + 5 % de CO₂.

4. Cultivo de expansión de células T infectadas

[0095] Se extrajeron las células infectadas y se monitorizó la densidad celular para mantenerla en $(0,5-1) \times 10^6$ células/ml para su uso en ejemplos posteriores. Las células T infectadas obtenidas se denominaron células CNCT19 (es decir, las células efectoras inmunitarias descritas en este documento).

Ejemplo 3. Detección de la expresión de moléculas CAR en la superficie de células CNCT19

[0096] Las etapas del experimento son las siguientes:

(1) La suspensión de células CNCT19 se centrifugó a 300 g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se añadió líquido envolvente ("sheath fluid") para resuspender hasta que la densidad de células viables alcanzó $(0,5-1) \times 10^7$ células/ml.

(2) Se tomaron dos tubos de citometría de flujo para cada muestra, y se etiquetaron como Tubo 1 y Tubo 2; el Tubo 1 fue un control en blanco y no fue necesario agregarle anticuerpos, y al Tubo 2 se agregaron 10 μ L de una dilución diez veces mayor del anticuerpo de cabra anti-F(ab')₂ de IgG de ratón Alexa Fluor® 647 (fabricante: Jackson, número de catálogo: 115-605-072).

(3) A cada tubo se agregaron 100 μ l de suspensión celular y la reacción se realizó durante 15 a 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente.

(4) A cada tubo se le añadieron 2 ml de líquido envolvente y se realizó centrifugación a 300 g durante 5 min.

(5) Se descartó el sobrenadante y se agregaron 20 μ l de FITC-CD3 (fabricante: Tongsheng Shidai, número de catálogo: Z6410047-100T) al tubo 2 y se incubó durante 15 a 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente.

(6) A cada tubo se le añadieron 2 ml de líquido envolvente para lavar, se realizó una centrifugación a 300 g durante 5 min, se descartó el sobrenadante, se añadieron 2 ml adicionales de líquido envolvente a cada tubo para lavar y se realizó una centrifugación a 300 g durante 5 min.

(7) Se descartó el sobrenadante y después se realizó la resuspensión agregando 300 μ l de líquido envolvente a cada tubo, se realizó la detección por citometría de flujo.

[0097] Los resultados se presentan en las Figura 1A y Figura 1B. Tal como se puede observar, la Figura 1A representa un tubo de control en blanco; su cuadrante superior derecho CD3+CAR+ no muestra población celular. La Figura 1B

representa un tubo de detección experimental. Las células CART se marcaron con anticuerpos IgG F(ab')₂ y CD3, y se detectó claramente una tasa de expresión de CAR del 68,6 % en el cuadrante CD3⁺CAR⁺ mediante citometría de flujo. Los resultados indican que las moléculas de CAR, según la presente divulgación, se expresan bien en la superficie de las células CNCT19.

5

Ejemplo 4. Detección del efecto de eliminación de las células CNCT19 sobre las células diana *in vitro*

[0098] Las etapas experimentales de este ejemplo son las siguientes:

- 1) Se seleccionaron como las células tumorales (es decir, células diana) la línea celular de leucemia humana CD19-positiva Nalm-6 (adquirida a Shanghai Enzyme Research Bioscience Co., Ltd., número de catálogo: CH179) y la línea celular de leucemia humana CD19-negativa KG-1a (adquirida a Shanghai Enzyme Research Bioscience Co., Ltd., número de catálogo: CC-Y1305), respectivamente. Como células efectoras, se seleccionaron, respectivamente, células CAR-T CD19 (células CNCT19 obtenidas en el Ejemplo 2) y células T no transfectadas (indicadas como NTD).
- 2) Las células diana y efectoras mencionadas anteriormente se mezclaron en proporciones efector/diana de 1:2 y 2:1, respectivamente, y se sembraron en una placa de 24 pocillos. El número total de células cocultivadas en cada pocillo se mantuvo en aproximadamente 1×10^6 /pocillo, y se establecieron tres pocillos paralelos para cada condición. Cada pocillo se llenó con 1 ml de solución de cultivo, la placa se colocó en una incubadora a 37 °C con 5 % de CO₂ para el cultivo y se registró el tiempo.
- 3) Tras 24 horas de cocultivo, se recogió la suspensión celular de cada pocillo, se transfirió a tubos de EP de 1,5 mL y se marcaron, respectivamente. Además, tras la centrifugación, el sobrenadante de cada tubo de muestra se succionó a un nuevo tubo de EP de 1,5 mL y se crioconservó a -20 °C para la posterior detección de citocinas (véase el Ejemplo 6 para más detalles).
- 4) Según el tipo de células tumorales, se añadió, respectivamente, la cantidad de anticuerpos de detección correspondiente a las células mixtas en cada pocillo para su marcaje, y se realizó una operación según las instrucciones del anticuerpo. Se utilizaron anticuerpos PE-CD10 para marcar las células Nalm-6, y anticuerpos Percp-cy5.5-CD45 para marcar las células KG-1a.
- 5) Se utilizó citometría de flujo para detectar el cambio en la proporción de diferentes células tumorales diana en cada muestra.

- [0099] Los resultados se muestran en la Figura 2. Tal como se puede observar, en comparación con el cocultivo con células T no transfectadas (es decir, NTD), el cocultivo de las células tumorales CD19-positivas Nalm-6 con células CAR-T (es decir, células CNCT19) condujo a una tasa residual significativamente reducida de Nalm-6; sin embargo, no hubo diferencia significativa en las tasas residuales de KG-1a después de que las células tumorales CD19 negativas KG-1a se cocultivaran con varias células efectoras. Específicamente, cuando la relación efector/diana fue 1:2, la coincubación de células CNCT19 con células Nalm-6 condujo a una tasa residual de células diana de $(2,8 \pm 1,3) \%$, que fue significativamente menor que la $((12,1 \pm 1,2) \%)$ (P < 0,01) resultante de la coincubación de células T no transfectadas con células Nalm-6. Probablemente, cuando la relación efector/diana fue de 2:1, la coincubación de células CNCT19 con células Nalm-6 condujo a una tasa residual de células diana de $(1,1 \pm 0,1) \%$, que fue significativamente menor que la de $(7,3 \pm 1,2) \%$ (P < 0,01) resultante de la coincubación de células T no transfectadas con células Nalm-6. Además, el efecto destructor de las células CNCT19 sobre las células tumorales CD19-positivas se incrementó con el aumento de la relación efector/diana.

Ejemplo 5. Monitorización en tiempo real de la función de eliminación de células CNCT19

- [0100] Las etapas experimentales son las siguientes:
- (1) Se extrajeron las células diana CHO-CD19, se aspiró y descartó la solución de cultivo del matraz de cultivo, se lavó el matraz de cultivo una vez con solución salina fisiológica, se añadió 1 ml de solución de tripsina con EDTA y se incubó en una incubadora a 37 °C durante 2 a 6 minutos antes de detener la digestión. Cabe destacar que las células CHO se adquirieron a Shanghai Enzyme Research Bioscience Co., Ltd., con el número de catálogo CC-Y2110; las secuencias moleculares de las células CD19 se obtuvieron del NCBI, y las secuencias moleculares de CD19 se construyeron en las células CHO mediante un procedimiento de biología molecular y las cepas de células diana CHO-CD19 se obtuvieron mediante cribado.
 - (2) Se añadió una cantidad adecuada de medio de cultivo al matraz de cultivo para formar una suspensión celular con las células diana, y se homogeneizaron las células mediante pipeteo. Tras el recuento de la concentración de la suspensión celular con una placa de recuento, se formuló la suspensión celular a una concentración celular de 1×10^5 células/ml, según lo requerido por los experimentos.
 - (3) Se añadieron 50 µl de medio de cultivo a los pocillos de la placa E 16 del sistema RTCA DP. La placa E 16 se colocó en la estación RTCA. El sistema RTCA escaneaba automáticamente ("Escanear placa") para comprobar si el contacto era correcto (la página "Mensaje" mostraba "Conexión correcta"). Se inició la detección de la línea base (Fondo) para asegurar que el pocillo seleccionado tuviera un contacto normal.
 - (4) Se extrajo la placa E 16 y se añadieron 100 µl de suspensión de células diana bien mezclada a los pocillos a 1×10^4 células por pocillo. La placa E 16 se colocó en una mesa de trabajo ultralimpia a temperatura ambiente durante 30 minutos y, a continuación, se colocó en la estación RTCA de la incubadora. Tras el escaneo automático del sistema ("Escanear placa"), se inició la etapa 2 para detectar dinámicamente la curva de proliferación celular en tiempo real.
 - (5) Se extrajo la placa E 16, se añadieron una suspensión de células diana y una suspensión de células CNCT19 a algunos pocillos, y la suspensión de células diana y suspensión de células T no transfectadas (es decir, NTD) (como

control) a otros pocillos, donde la relación efector/diana (es decir, la relación de células efectoras con respecto a células diana, es decir, células CNCT19: células diana; y NTD: células diana) fue de 1:1, y el volumen de la suspensión de células diana fue de 50 µl. La placa de detección placa E 16 se colocó en la plataforma de detección RTCA DP para monitorización en tiempo real de 60 horas, con el fin de observar el efecto de las células CNCT19 sobre las células diana.

[0101] Los resultados se muestran en la Figura 3. En la figura, la línea 1 representa la curva del grupo control con NTD y la línea 2 representa la curva del grupo tratado con CNCT19. Al comparar las líneas 1 y 2, se puede observar que la proliferación de células tumorales (es decir, células diana) fue inhibida por las células CNCT19 con el tiempo. Específicamente, tras la coincubación con células T no transfectadas, las células diana no mostraron cambios significativos en su tendencia de crecimiento (línea 1). Por el contrario, tras la coincubación con células CNCT19, las células diana mostraron una disminución significativa en su tendencia de crecimiento, e incluso comenzaron a mostrar una disminución en su número (línea 2). Esto demuestra que CNCT19 tiene una fuerte capacidad destructora contra las células diana.

Ejemplo 6. Detección de citocinas secretadas tras el cocultivo de células CNCT19 con células diana.

[0102] Las etapas experimentales de este ejemplo son las siguientes:

- 1) La muestra de sobrenadante del cultivo mixto en cada pocillo del Ejemplo 4 (es decir, la muestra obtenida en la etapa 3) se sacó del refrigerador a -20 °C y se fundió a temperatura ambiente;
- 2) Se utilizó un kit LEGENDplex™ (fabricante: Biolegend, número de catálogo: 740013) para tratar cada muestra de acuerdo con las instrucciones; y
- 3) Los niveles de diferentes citoquinas en cada muestra se detectaron mediante citometría de flujo.

[0103] Los resultados se muestran en las Figuras 4A y 4B. En comparación con las células T no transfectadas (es decir, NTD), el cocultivo de células CAR-T (es decir, células CNCT19) con células Nalm-6 (CD19⁺) resultó en una secreción significativamente mayor de las citocinas IFN-γ e IL-6 por las células CAR-T. Específicamente, después del cocultivo con las células diana en una relación efector/diana de 2:1 durante 24 horas, las células CNCT19 fueron estimuladas por las células diana para secretar IFN-γ en una cantidad de (6186,37 ± 861,13) pg/ml, que fue significativamente mayor que la cantidad de IFN-γ (2096,85 ± 228,16 pg/ml, P < 0,05) secretada por las células T no transfectadas; la cantidad de IL-6 (32,22 ± 1,46 pg/ml) secretada por las células CNCT19 fue significativamente mayor que (12,23 ± 4,37 pg/ml, P < 0,05) secretada por las células T no transfectadas.

Ejemplo 7. Detección de hemólisis e irritación de células CNCT19

7.1. Prueba de hemólisis de células CNCT19 *in vitro*

[0104] Las etapas experimentales de este ejemplo son las siguientes:

- 1) Se utilizaron un total de 7 tubos de ensayo de vidrio numerados del 1 al 7, y a cada tubo se le agregaron 2,5 mL de suspensión de glóbulos rojos de conejo al 2 % (obtenida de conejos de Nueva Zelanda y producida por los Institutos Nacionales de Control de Alimentos y Medicamentos de China, con un número de certificación de calidad de No. 11400500032425).
- 2) Se añadieron diferentes dosis (de 0,5 a 0,1 mL) de células CNCT19 a una concentración de 1×10⁷ células/mL (basado en el número total de células T) a los tubos 1 a 5, que ya contenían diferentes dosis (de 2,0 a 2,4 mL) de inyección de cloruro de sodio. Paralelamente, se añadieron 2,5 mL de inyección de cloruro de sodio (control negativo) y 2,5 mL de inyección de agua estéril (control positivo) a los tubos 6 y 7, respectivamente.
- 3) Cada tubo de ensayo tenía un volumen total de 5,0 mL. Los tubos de ensayo se colocaron en una incubadora a 37 °C ± 0,5 °C para una incubación durante 3 h. Se observó si los glóbulos rojos se lisaron o se agregaron a los 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas y 3 horas después de que los tubos de ensayo se colocaran en la incubadora.

[0105] Los resultados se muestran en las Figuras 5A y 5B. La Figura 5A muestra los resultados observados de cada tubo de ensayo antes de agitarlo durante 3 horas, y la Figura 5B muestra los resultados observados de cada tubo de ensayo después de agitar durante 3 horas. Se puede observar que en el tubo de control negativo (No. 6), el líquido sobrenadante era incoloro y claro, y los glóbulos rojos se hundieron en el fondo del tubo, y después de agitar, se dispersaron uniformemente; se concluyó que no hubo hemólisis ni agregación. En el tubo de control positivo (No. 7), la solución era clara y roja sin capas separadas, y no había residuos de glóbulos rojos en el fondo del tubo; se concluyó que hubo hemólisis completa. Al observar cada uno de los tubos de ensayo, a los que se añadieron diferentes dosis de células CNCT19, durante 3 horas, se puede observar que el líquido sobrenadante en cada tubo de ensayo era incoloro y claro, y los glóbulos rojos se hundieron en el fondo del tubo, y después de agitar, se dispersaron uniformemente; se concluyó que no hubo hemólisis ni agregación.

7.2. Prueba de irritación vascular tras la infusión intravenosa de células CNCT19

[0106] Las etapas experimentales de este ejemplo son las siguientes:

1) Se seleccionaron seis conejos neozelandeses (tres machos y tres hembras) que habían pasado la inspección de cuarentena y no presentaban anomalías en los puntos de inyección. Se utilizó un procedimiento de autocontrol: se infundieron por vía intravenosa células CAR-T crioconservadas (es decir, células CNCT19) y un control negativo (inyección de cloruro de sodio), respectivamente, en las orejas derecha e izquierda de cada animal.

2) Las células CAR-T infundidas a través de las venas marginales de la oreja derecha estaban a una concentración de 1×10^7 células /ml y tenían una dosis de 1×10^7 células /kg (basado en el número total de células T). La inyección de cloruro de sodio, administrada a través de las venas marginales de la oreja izquierda, se utilizó como control negativo. La dosis administrada por vía intravenosa, tanto a través de las venas marginales de la oreja izquierda como de la derecha, fue de 1 ml/kg.

3) Después de la administración intravenosa, se realizaron una observación general, una observación de los sitios de inyección y un examen patológico de los animales.

[0107] Los resultados se muestran en las Figuras 6A y 6B. La Figura 6A muestra una micrografía (teñida con HE, lente objetivo de 10x) del sitio de inyección después de la administración de células CAR-T, y la Figura 6B muestra una micrografía (teñida con HE, objetivo 10x) del lugar de la inyección tras la administración de una inyección de cloruro de sodio. Se puede observar que, tras la infusión intravenosa de las células CAR-T crioconservadas, en comparación con el control negativo, no se observaron síntomas sistémicos ni locales ni anomalías patológicas en los animales.

Ejemplo 8. Experimento de oncogenicidad de células CNCT19 *in vitro*

[0108] Las etapas experimentales de este ejemplo son las siguientes:

1) Se incubaron, respectivamente, células CAR-T (células CNCT19) de dos donantes en agar blando. Los donantes fueron el Donante 1 (células T de donante humano sano, número de lote: TC20180613015) y el Donante 2 (células T de donante humano sano, número de lote: TC20180613016), respectivamente. Además, se fijó la línea celular de fibroblastos pulmonares embrionarios humanos MRC-5 como control negativo y la línea celular de cáncer cervical humano Hela como control positivo.

2) En el experimento se utilizó una placa de cultivo de 6 pocillos. El número de células en cada pocillo fue de aproximadamente 1×10^3 , y se establecieron tres pocillos paralelos para cada grupo. La placa de cultivo se colocó en una incubadora de CO₂ para el cultivo y se realizó observación durante 3 semanas.

3) La placa de cultivo se extrajo cada semana para observar si había formación de clones con un microscopio y tomar fotografías. El experimento se detuvo hasta que se observó la formación de un clon evidente en el grupo de control positivo.

[0109] Los resultados se muestran en la Figura 7. Se puede observar que las células de control positivo (Hela) formaron clones en el medio de cultivo, y el tamaño de los clones aumentó significativamente con el tiempo. El día 23 de observación, las células CAR-T de diferentes donantes y las células de control negativo (MRC-5) no mostraron crecimiento clonal y todas murieron, sin caracterizarse por proliferación inmortalizada *in vitro*.

Ejemplo 9. Experimento de tumorigenicidad de células CNCT19 *in vivo*

[0110] Las etapas experimentales de este ejemplo son las siguientes:

1) A ratones desnudos BALB/c se les inocularon por vía subcutánea células CAR-T crioconservadas (es decir, células CNCT19) de dos donantes y células T no transfectadas correspondientes (es decir, NTD), respectivamente, donde los dos donantes fueron el donante 2 (células T de donante humano sano, número de lote: TC20180613016) y el donante 3 (células T de donante humano sano, número de lote: TC20180808019).

2) La inoculación con células CAR-T se realizó a 1×10^7 células/ratón (en base al número total de células T). El grupo de control negativo se inoculó con 1×10^7 células MRC-5 de la línea celular de fibroblastos pulmonares de embriones humanos por ratón, y el grupo de control positivo se inoculó con 1×10^6 células Hela de la línea de cáncer cervical humano por ratón.

3) Se realizó una observación continua durante 16 semanas para detectar si se producía un cambio en el peso corporal, si se generaban nódulos y si los nódulos se convertirían en nódulos tumorales. Los resultados se compararon con los de los grupos celulares negativos y positivos.

4) Tras la observación, se realizó la anatomía macroscópica. Se pesó cada órgano y se calculó el coeficiente orgánico. Los sitios de inoculación y los tejidos u órganos con síntomas sospechosos se sometieron a examen histopatológico.

[0111] Los resultados muestran que las células CAR-T no son tumorígenas *in vivo*. En el grupo de control negativo (inoculado con células MRC-5), los nódulos líquidos de todos los animales desaparecieron antes del noveno día de la inoculación. En el grupo de control positivo (inoculado con células HeLa), los nódulos subcutáneos de todos los animales aumentaron lentamente. El examen patológico mostró que estos nódulos se debieron al crecimiento de tejido tumoral, con una tasa de formación de tumores del 100 %. En resumen, este experimento fue válido. En el grupo inoculado con células CAR-T (derivadas de dos donantes) y células T no transfectadas, todos los nódulos líquidos desaparecieron al quinto día después de la inoculación y no se volvió a formar ningún nódulo antes de la eutanasia realizada el día 114. El examen patológico mostró que no se formó tumor en los sitios de inoculación ni metástasis.

Ejemplo 10. Prueba de toxicidad de una única inyección intravenosa de células CNCT19 en ratones NCG con tumores de xenoinjerto Nalm-6.

[01112] Las etapas experimentales de este ejemplo son las siguientes:

1) Se utilizaron ratones NCG de 6 a 8 semanas de edad, en los que la mitad eran machos. Tres días antes de la administración, se inyectó una suspensión de células Nalm-6 en las venas de la cola a una concentración de $2,5 \times 10^6$ células/ml y a una dosis de 10 ml/kg.

2) Los animales cribados se dividieron aleatoriamente en 4 grupos equilibrados por sexo según su peso corporal (es decir, grupos 2 a 5). Los grupos 2 a 5 fueron un grupo de control de vehículo, un grupo de control de células T y un grupo con células CAR-T a dosis baja y un grupo con células CAR-T a dosis alta, respectivamente, con 40 animales (20 machos y 20 hembras) en cada grupo. Tanto el grupo de control sin tumor (es decir, grupo 1) como el grupo de control de vehículo (es decir, grupo 2) recibieron un control de vehículo (es decir, solución salina fisiológica que contenía albúmina humana al 4 % (p/v)). El grupo de control de células T (es decir, grupo 3) recibió células T no transfectadas (es decir, NTD) a una dosis de 1×10^9 células/kg (basado en el número total de células T, lo mismo de aquí en adelante). El grupo de dosis baja de células CAR-T (grupo 4) fue inoculado a una dosis de 1×10^8 células/kg y el grupo de dosis alta de células CAR-T (grupo 5) fue inoculado a una dosis de 1×10^9 células/kg.

3) La dosis para cada animal fue de 25 mL/kg, la administración se realizó mediante una única inyección intravenosa y la velocidad de administración fue de aproximadamente 1 mL/min.

4) Tras la administración, se realizó una observación continua durante 4 horas el día de la administración. Durante la prueba, se realizó una observación clínica general una vez por la mañana y otra por la tarde cada día. Se realizó una observación clínica detallada y se midió el peso corporal y la ingesta de alimentos una vez por semana. Durante la prueba, se detectaron la temperatura corporal, los indicadores clinicopatológicos (recuento de glóbulos rojos e índices bioquímicos sanguíneos) y los indicadores inmunológicos (subpoblaciones de linfocitos T, citocinas y proteína C reactiva).

5) En los grupos 1 a 5, se sacrificaron 10 animales/sexo/grupo el día 2 y 5 animales/sexo/grupo el día 15. Se pesaron sus órganos y se realizó una observación anatómica macroscópica. Los órganos principales de los animales de los grupos 1 y 5 se sometieron a examen histopatológico.

[01113] Los resultados de este experimento muestran que la dosis máxima tolerada de células CAR-T (es decir, células CNCT19) para una sola administración fue superior a 1×10^9 células/kg. Durante la prueba, ninguno de los animales del grupo con células CAR-T a dosis baja ni del grupo con células CAR-T a dosis alta presentó muerte ni agonía. No se observó ninguna reacción anormal ni en la observación clínica general ni en la detallada. No se observaron cambios anormales evidentes en el peso corporal, la ingesta de alimentos, la temperatura corporal, la proteína C reactiva ni en los índices bioquímicos sanguíneos. El examen histopatológico no reveló ninguna anomalía evidente en el grupo con células CAR-T a dosis baja ni en el grupo con células CAR-T a dosis alta, en comparación con el grupo control de células T.

Ejemplo 11. Tratamiento de animales con células CNCT19

11.1. Efecto terapéutico de las células CNCT19 en ratones NCG con tumores de xenoinjerto Nalm-6

[01114] Las etapas experimentales de este ejemplo son las siguientes:

1) Se utilizaron ratones NCG hembra de 6 a 8 semanas de edad. Tres días antes de la administración, se inyectaron 5×10^5 células Nalm-6 en las venas de la cola, donde células se disolvieron en solución salina fisiológica a una concentración de $2,5 \times 10^6$ células/ml, y a cada ratón se le inyectaron 200 μ l de resuspensión celular.

2) A cada grupo experimental se le inyectaron las células CAR-T correspondientes (es decir, células CNCT19), células T no transfectadas (es decir, NTD) o solución de conservación de células (es decir, solución salina fisiológica que contenía albúmina humana al 4 % (p/v)). Se dividieron un total de cinco grupos de la siguiente manera: grupo de dosis baja de CAR-T (inyectado con células CNCT19 a 5×10^6 células/ratón en base al número total de células T, lo mismo de aquí en adelante), grupo de dosis media de CAR-T (inyectado con células CNCT19 a 1×10^7 células/ratón), grupo de dosis alta de CAR-T (inyectado con células CNCT19 a 2×10^7 células/ratón), grupo de control de células T (inyectado con células T no transfectadas a 2×10^7 células/ratón) y grupo de control de vehículo (inyectado con solución de conservación de células a 200 μ l/ratón). El volumen de inyección por ratón fue de 200 μ l.

3) Se detectó el peso corporal y se realizó una observación clínica general dos veces por semana. Se registró la supervivencia de los ratones y se trazaron curvas de supervivencia.

[01115] Los resultados se muestran en la Figura 8. Tal como se puede observar, las células CNCT19, en todas las dosis, tienen efectos significativos en la prolongación del tiempo de supervivencia, y estos efectos son obviamente dependientes de la dosis. Específicamente, la mediana del tiempo de supervivencia del grupo control con solución salina fisiológica fue de 24 días, la del grupo control con NTD fue de 23 días y la del grupo de dosis baja de CNCT19 fue de 40 días, mientras que todos los animales experimentales de los grupos de dosis media y alta de CNCT19 sobrevivieron hasta el final del período de observación. En comparación con el grupo de solución salina fisiológica y el grupo control con NTD, todos los grupos de dosis de CNCT19 pueden prolongar el tiempo de supervivencia de los animales con leucemia en más de 16 días.

11.2. Distribución de células CNCT19 en animales

[01116] Las etapas experimentales de este ejemplo son las siguientes:

1) Se utilizaron ratones NCG de 6 a 8 semanas de edad, donde la mitad eran machos. Se establecieron modelos tumorales de xenoinjerto Nalm-6 mediante el procedimiento del Ejemplo 11.1.

2) Tanto los animales portadores de tumores como los no portadores recibieron una única inyección en la vena de la cola de células CAR-T (es decir, células CNCT19) en una dosis de 5×10^6 células/ratón (en base al número total de células T).

3) Los animales del grupo portador de tumor se sacrificaron según lo planeado a las 24 horas (es decir, D2), 72 horas (es decir, D4), 168 horas (es decir, D8), 336 horas (es decir, D15), 504 horas (es decir, D22) y 672 horas (es decir, D29) respectivamente después de la administración. Los animales del grupo sin tumores se sacrificaron según lo planeado a las 24 horas (es decir, D2), 168 horas (es decir, D8) y 336 horas (es decir, D15) respectivamente, después de la administración. Se recogieron en orden de los animales sangre completa (anticoagulación con EDTA), cerebro, médula espinal (segmento cervical), músculo esquelético, gónadas (ovarios, testículos y epidídimo), vejiga, estómago, intestino delgado, ganglios linfáticos mesentéricos, médula ósea, hígado, riñón, bazo, corazón, pulmón y otros tejidos o fluidos corporales.

4) Se determinó el contenido de receptores de antígenos quiméricos (es decir, CAR) en sangre y varias muestras de tejido utilizando un procedimiento Q-PCR validado.

[0117] Los resultados muestran que después de ser administradas a ratones portadores de tumores y ratones sin tumores mediante una única inyección intravenosa a una dosis de 5×10^6 células/ratón, las células CNCT19 se distribuyeron principalmente en la sangre completa y en los tejidos con gran flujo sanguíneo, tales como pulmón, hígado, corazón y bazo (véase la Figura 9). Entre ellos, el corazón y la sangre completa presentaron la mayor distribución, con áreas bajo la curva (el número de copias de la molécula de ácido nucleico que codifica CAR en ADN_g-tiempo, AUC) de aproximadamente 150.000 horas*número de copias/μg. Se siguió con el pulmón y la médula espinal, con un AUC de aproximadamente 40.000 a 60.000 horas*número de copias/μg. En cuanto al bazo, el hígado y otros tejidos, el AUC fue inferior a aproximadamente 20.000 horas*número de copias/μg.

[0118] Los resultados también muestran que el contenido de células CNCT19 en el tejido de los ratones portadores de tumores era ligeramente superior al de los ratones no portadores de tumores (véase la Figura 10). Las concentraciones de células CNCT19 en la sangre completa, el corazón y la médula espinal de los ratones portadores de tumores fueron aproximadamente 3, 6 y 5 veces mayores que las de los ratones no portadores de tumores 24 horas después de la administración.

[0119] Posteriormente, el contenido de fármaco en cada tejido disminuyó gradualmente y prácticamente cayó por debajo del límite de detección metodológica dos semanas después de la administración. A medida que la enfermedad progresaba, con la estimulación intensificada del antígeno CD19, las células CNCT19 de los ratones volvieron a proliferar reactivamente (véase la Figura 11), donde la concentración de células CNCT19 en el cerebro, pulmón, hígado, sangre completa y médula espinal aumentó a más de 1200 copias/μg de ADN, e incluso alcanzó 3500 copias/μg de ADN.

Ejemplo 12. Tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda con células CNCT19

12.1. Uso clínico de las células CNCT19

[0120] El proceso de aplicación clínica se muestra en la Tabla 1, y las etapas experimentales específicas en algunas etapas se describen a continuación.

Tabla 1. El proceso de aplicación clínica de células CNCT19

Visita	Fecha	Descripción
Periodo de cribado	De semana -6 a semana -4	Los pacientes se criban
		↓
	Comienzo en la semana -4	Se recogen PBMCs mediante aféresis de los sujetos que se cribaron con éxito para preparar la suspensión de células CNCT19 y la preparación de células lleva 3-4 semanas.
		↓
	Comienzo en el día -5	Los índices de seguridad se comprueban antes del tratamiento previo de disección de nódulos linfáticos
		↓

		Los sujetos se someten al tratamiento previo de disección de nódulos linfáticos
		↓
	Comienzo en el día -1	Se obtienen los datos de referencia
		↓
Periodo de tratamiento	En el día 0	Después de comprobar los índices de seguridad, las células se vuelven a infundir
		↓
	En los días 2, 4, 7, 10, 14 y 21	Se lleva a cabo una prueba de seguridad y se realiza una visita a los sujetos y se examinan y se evalúan de acuerdo con el diagrama de flujo de investigación
		↓
	En el día 28	Después de la finalización del tratamiento, se lleva a cabo un examen y se realiza una visita a los sujetos y se examinan y se evalúan de acuerdo con el diagrama de flujo de investigación
		↓
Periodo de seguimiento	Se realiza una vez al mes durante 6 meses	Se realiza una visita a los sujetos y se examinan y se evalúan de acuerdo con el diagrama de flujo de investigación
		↓
	Se realizó un seguimiento de supervivencia libre de recurrencia una vez cada tres meses	Se realiza una visita a los sujetos y se examinan y se evalúan de acuerdo con el diagrama de flujo de investigación
	Se realizó un seguimiento de supervivencia general una vez cada tres meses durante un periodo de 2 años	Se puede completar el seguimiento por teléfono para obtener la información sobre el estado de supervivencia de los sujetos y su tratamiento antitumoral

1. Pretratamiento de la disección de ganglios linfáticos

5 [0121] El pretratamiento de disección de ganglios linfáticos se realiza el día -5 antes de que se vuelva a infundir la suspensión de células CNCT19 según lo planeado.

10 [0122] Los esquemas de pretratamiento son los siguientes:
se administra fludarabina a 30 mg/m² una vez al día durante 2-4 días consecutivos; y se administra ciclofosfamida a 500 mg/m² una vez al día durante 2 días consecutivos.

[0123] El uso de los dos fármacos para la quimioterapia previa al tratamiento debe iniciarse el mismo día.

2. Reinfusión de suspensión de células CNCT19

15 [0124]
(1) Después de que las células se preparen con éxito, se criopreservan en condiciones de <-100 °C, se transportan al hospital en la misma condición de temperatura para su uso y se recuperan de acuerdo con la guía de operación del experimento antes de la infusión.

20 (2) El procedimiento para reinfundir células es el siguiente. Las células se recuperan según la guía de operación del experimento, y la reinfusión de la suspensión celular debe completarse dentro de los 30 minutos posteriores a la recuperación. La suspensión celular se infunde en una sola infusión al sujeto a través de una vena con un dispositivo de transfusión sanguínea. Si hay más de una bolsa de suspensión celular, se pueden infundir de manera continua sin intervalo de tiempo entre la reinfusión de cada bolsa. El sujeto debe ser observado cuidadosamente durante la reinfusión celular. Si se produce un evento adverso grave, se debe suspender la infusión y se debe realizar el

25 tratamiento correspondiente según el evento adverso específico. Si no se produce ningún evento adverso grave, se puede realizar un seguimiento según el flujo de trabajo de la visita.

(3) El sujeto debe ser observado cuidadosamente durante 24 horas después de la reinfusión celular. Si se presenta

un evento adverso grave, se debe realizar el tratamiento correspondiente según el evento adverso específico. Si no se presenta ningún evento adverso grave, se puede realizar un seguimiento según el flujo de trabajo de la visita.

(4) Después de la reinfusión celular, el sujeto deberá continuar hospitalizado para observación durante 14 días o por un período determinado según la evaluación integral del estado del sujeto por parte del investigador.

3. Manejo de la suspensión de células CNCT19

[0125] Para gestionar y utilizar rigurosamente la suspensión de células CNCT19, se ha establecido un sistema riguroso de gestión de la suspensión de células CNCT19 por parte de personal específicamente asignado. Se asigna personal específico para transportar la suspensión de células para investigación a los departamentos del hospital, y se le asigna a personal específico la responsabilidad de recepción de la suspensión celular para investigación y establecimiento de un sistema de registro.

[0126] Después de la infusión, el envase de la suspensión celular es recuperado y almacenado/destruido por el personal de gestión de medicamentos.

4. Resultados de eficacia clínica y seguridad de la suspensión de células CNCT19 en el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda recidivante o refractaria

[0127] Este experimento comenzó de septiembre de 2016 a octubre de 2020. Durante los ensayos clínicos exploratorios y de fase I, 63 pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA) recidivante o refractaria (con 23 pacientes adultos y 40 pacientes niños) fueron tratados con CNCT. La dosis explorada administrada para LLA en adultos varió de $0,25 \times 10^8$ a $0,5 \times 10^8$ células T CAR-positivas.

(a) Los datos sobre la eficacia clínica se muestran en la Tabla 2 y la Tabla 3. La Tabla 2 muestra la recuperación de 63 pacientes, incluyendo adultos y niños. La Tabla 3 muestra la recuperación de los 23 pacientes adultos. Se puede observar que entre los 63 pacientes con leucemia linfoblástica aguda recidivante o refractaria, después de la inyección y reinfusión de la suspensión de células CNCT19, la gran mayoría (93,7 %) de los pacientes estaban en remisión completa y el 88,9 % de los pacientes eran negativos a la MRD. Los resultados muestran que la inyección y reinfusión de la suspensión de células CNCT19 pueden tratar eficazmente a pacientes adultos y niños con leucemia linfoblástica aguda recidivante o refractaria.

Tabla 2: La eficiencia clínica de la suspensión de células CNCT19 en el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda en adultos y niños

Adultos y niños con leucemia linfoblástica aguda recidivante o refractaria N = 63	
ORR	93,7% (59/63)
CR/Cri	93,7% (59/63)
MRD negativa	88,9% (56/63)

Tabla 3: La eficacia clínica de la suspensión de células CNCT19 en el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda en adultos

Adultos con leucemia linfoblástica aguda recidivante o refractaria N = 23	
ORR	91,3% (21/23)
CR/Cri	91,3% (21/23)
MRD negativa	86,9% (20/23)

Nota: en las Tablas 2 y 3,

ORR representa tasa de remisión global;

ERM (Enfermedad residual mínima) negativa significa que no se detecta ninguna célula tumoral (mediante el método más sensible);

CR significa remisión completa; y

Cri representa remisión morfológica completa con recuperación de recuento sanguíneo incompleto.

[0128] b) Los datos de los resultados preliminares de seguridad se muestran en la Tabla 4 y la Tabla 5. La Tabla 4 muestra los resultados de seguridad para 63 pacientes, incluyendo pacientes adultos y niños, y la Tabla 5 muestra los resultados de seguridad para 23 pacientes adultos. Entre los 63 pacientes con LLA, la incidencia de CRS de grado 3 y superior y la de encefalopatía fueron del 19 % y el 20,6 %, respectivamente. Una comparación entre los grupos de edad revela que la incidencia (39,1 %) de CRS grave en el grupo de adultos es mayor que la (7,5 %) en el grupo de niños, y la incidencia (17,4 %) de CRES grave en el grupo de adultos es ligeramente menor o cercana (22,6 %) a la del grupo de niños. Esto puede deberse al hecho de que en los primeros ensayos, CNCT19 se administró según el peso corporal, y los pacientes adultos con mayor peso corporal recibieron dosis más altas. Por ejemplo, la dosis administrada a los 46 sujetos en los primeros ensayos varió de $0,71 \times 10^6$ y $4,08 \times 10^6$ /kg, equivalente a $0,16 \times 10^8$ - $2,36 \times 10^8$ células T CAR-positivas. A medida que la exploración inicial de la dosis arrojó luz gradualmente sobre las características de los productos CNCT19, se seleccionó un intervalo de dosis más seguro en estudios clínicos posteriores. Por ejemplo, entre los 17 pacientes que recibieron una dosis que varió de $0,2 \times 10^8$ a $1,1 \times 10^8$ células T CAR-positivas (valor medio: $0,5 \times 10^8$), la incidencia de CRS de grado ≥ 3 y CRES descendió al 5,9 % (1/17).

[0129] Se puede observar que la inyección de la suspensión de células CNCT19 tiene una baja probabilidad de causar

efectos secundarios graves de CRS o CRES, su seguridad general es controlable y, por lo tanto, CNCT19 presenta una buena acción de seguridad. Esta buena acción de seguridad de CNCT19 mejora la calidad de los productos y reduce los riesgos clínicos.

5 Tabla 4. Los resultados de seguridad de la suspensión de células CNCT19 para adultos y niños con leucemia linfoblástica aguda

		Síndrome de liberación de citocinas (CRS)		Síndrome de encefalopatía relacionada con células CAR-T (CRES)	
		Todos los grados	Grado ≥ 3	Todos los grados	Grado ≥ 3
Adultos + niños con leucemia linfoblástica aguda	Total (n = 63)	54 (85,7%)	12 (19%)	22 (34,9%)	13 (20,6%)

Tabla 5. Los resultados de seguridad de la suspensión de células CNCT19 para adultos con leucemia linfoblástica aguda

		Síndrome de liberación de citocinas (CRS)		Síndrome de encefalopatía relacionada con células CAR-T (CRES)	
		Todos los grados	Grado ≥ 3	Todos los grados	Grado ≥ 3
Adultos con leucemia linfoblástica aguda	Total (n=23)	20 (86,9%)	9 (39,1%)	8 (34,8%)	4 (17,4%)

Nota: en las Tablas 4 y 5, CRS representa síndrome de liberación de citocinas; y CRES representa síndrome de encefalopatía relacionada con células CAR-T.

10 Ejemplo 13. Tratamiento del linfoma no Hodgkin recidivante o refractario con células CNCT19

13.1. Uso clínico de las células CNCT19

15 [0130] El proceso de aplicación clínica se muestra en la Tabla 6, y las etapas experimentales específicas en algunas etapas se describen a continuación.

Tabla 6. El proceso de aplicación clínica de células CNCT19

Visita	Fecha	Descripción
Periodo de cribado	Semana -8 hasta el momento antes de la aféresis	Los pacientes son cribados
		↓
	Semana -7 hasta el día -1	Se recogen PBMCs mediante aféresis a partir de sujetos cribados con éxito para preparar una suspensión de células CNCT19 y la preparación de células lleva 3-4 semanas
		↓
	Día -5 hasta día -2	Los índices de seguridad se comprueban antes del tratamiento previo de disección de nódulos linfáticos
		↓
		Los sujetos se someten al tratamiento previo de disección de nódulos linfáticos
		↓
		Se obtienen los datos de referencia

	Comienzo el día -1	↓
Periodo de tratamiento	En el Día 0	Después de comprobar los índices de seguridad, las células se vuelven a infundir
		↓
	En los Días 2, 4, 7, 10, 14 y 21	Se lleva a cabo una prueba de seguridad y se realiza una visita a los sujetos y se examinan y se evalúan de acuerdo con el diagrama de flujo de investigación
		↓
	En el Día 28	Después de la finalización del tratamiento, se lleva a cabo un examen y se realiza una visita a los sujetos y se examinan y se evalúan de acuerdo con el diagrama de flujo de investigación
		↓
Periodo de seguimiento	El seguimiento de la tasa de remisión global se llevó a cabo una vez al mes durante 6 meses.	Se realiza una visita a los sujetos y se examinan y se evalúan de acuerdo con el diagrama de flujo de investigación
		↓
	Se realizó un seguimiento de supervivencia sin recurrencia una vez cada tres meses	Se realiza una visita a los sujetos y se examinan y se evalúan de acuerdo con el diagrama de flujo de investigación
	Se realizó un seguimiento de supervivencia general una vez cada tres meses durante un periodo de 2 años	Se puede completar el seguimiento por teléfono para obtener la información sobre el estado de supervivencia de los sujetos y su tratamiento antitumoral

1. Pretratamiento de la disección de ganglios linfáticos

5 [0131] El pretratamiento de disección de ganglios linfáticos se realiza el día -5 antes de que se vuelva a infundir la suspensión de células CNCT19 según lo planeado.

10 [0132] Los esquemas de pretratamiento son los siguientes:
se administra fludarabina a 30 mg/m² una vez al día durante 2-4 días consecutivos; y se administra ciclofosfamida a 500 mg/m² una vez al día durante 2 días consecutivos.

[0133] El uso de los dos fármacos para la quimioterapia previa al tratamiento debe iniciarse el mismo día.

2. Reinfusión de suspensión de células CNCT19

15 [0134]
(1) Después de que las células se preparen con éxito, se criopreservan en condiciones de <-100 °C, se transportan al hospital en la misma condición de temperatura para su uso y se recuperan de acuerdo con la guía de operación del experimento antes de la infusión.

20 (2) El procedimiento para reinfundir células es el siguiente. Las células se recuperan según la guía de operación del experimento, y la reinfusión de la suspensión celular debe completarse dentro de los 30 minutos posteriores a la recuperación. La suspensión celular se infunde en una sola infusión al sujeto a través de una vena con un dispositivo de transfusión sanguínea. Si hay más de una bolsa de suspensión celular, se pueden infundir de manera continua sin intervalo de tiempo entre la reinfusión de cada bolsa. El sujeto debe ser observado cuidadosamente durante la reinfusión celular. Si se produce un evento adverso grave, se debe suspender la infusión y se debe realizar el

25 tratamiento correspondiente según el evento adverso específico. Si no se produce ningún evento adverso grave, se puede realizar un seguimiento según el flujo de trabajo de la visita.

(3) El sujeto debe ser observado cuidadosamente durante 24 horas después de la reinfusión celular. Si se presenta un evento adverso grave, se debe realizar el tratamiento correspondiente según el evento adverso específico. Si no se presenta ningún evento adverso grave, se puede realizar un seguimiento según el flujo de trabajo de la visita.

30 (4) Después de la reinfusión celular, el sujeto deberá continuar hospitalizado para observación durante 14 días o por un período determinado según la evaluación integral del estado del sujeto por parte del investigador.

3. Manejo de la suspensión de células CNCT19

[0135] Para gestionar y utilizar rigurosamente la suspensión de células CNCT19, se ha establecido un sistema riguroso de gestión de la suspensión de células CNCT19 por parte de personal específicamente asignado. Se asigna personal específico para transportar la suspensión de células para investigación a los departamentos del hospital, y se le asigna a personal específico la responsabilidad de recepción de la suspensión celular para investigación y establecimiento de un sistema de registro.

[0136] Después de la infusión, el envase de la suspensión celular es recuperado y almacenado/destruido por el personal de gestión de medicamentos.

4. Resultados de eficacia clínica y seguridad de la suspensión de células CNCT19 en el tratamiento del linfoma no Hodgkin recidivante o refractario

[0137] Este experimento comenzó de septiembre de 2016 a octubre de 2020. Durante los ensayos clínicos exploratorios y de fase I, 50 pacientes con linfoma no Hodgkin (LNH) recidivante o refractario fueron tratados con suspensión de células CNCT19. La dosis explorada administrada para LNH (solo en adultos) varió de 1×10^8 a 2×10^8 células T CAR-positivas.

(a) Los datos sobre la eficacia clínica se muestran en la Tabla 7. La Tabla 7 muestra la recuperación de 50 pacientes. Se puede observar que entre los 50 pacientes con linfoma no Hodgkin recidivante o refractario, después de la inyección y reinfusión de la suspensión de células CNCT19, aproximadamente el 80 % de los pacientes estaban en remisión completa o remisión parcial, donde la tasa de remisión completa fue del 54 % (27 casos) y la tasa de remisión parcial fue del 24 % (12 casos). Esto demuestra que la suspensión de células CNCT19 puede tratar eficazmente a pacientes con linfoma no Hodgkin recidivante o refractario.

Tabla 7: La eficacia clínica de la suspensión de células CNCT19 en el tratamiento de linfoma no Hodgkin

Linfoma no Hodgkin recidivante o refractario N = 50		
	ORR	78 % (39/50)
	CR	54 % (27/50)
	PR	24 % (12/50)

Nota: en la tabla 7

ORR representa la tasa de remisión global

CR representa la remisión completa; y

PR representa la remisión parcial.

b) Los datos de los resultados de seguridad preliminares se muestran en la Tabla 8. Esta tabla 8 muestra los resultados de seguridad de 50 pacientes. Se puede observar que la inyección de la suspensión de células CNCT19 tiene una baja probabilidad de causar efectos secundarios graves de CRS o CRES, y una probabilidad de causar efectos secundarios de grado ≥ 3 inferior al 10 %, donde la probabilidad de causar CRS de grado ≥ 3 del 0 % y la probabilidad de causar CRES de grado ≥ 3 del 6 %. Por lo tanto, CNCT19 presenta una buena acción de seguridad.

Tabla 8: Los resultados de seguridad de la suspensión de células CNCT19 para linfoma no Hodgkin

		Síndrome de liberación de citocinas (CRS)		Síndrome de encefalopatía relacionada con células CAR-T (CRES)	
		Todos los grados	Grado ≥ 3	Todos los grados	Grado ≥ 3
Linfoma no Hodgkin	Total (n = 50)	30 (60 %)	0 (0)	3 (6 %)	3 (6%)

Nota: en la Tabla 8,

CRS representa síndrome de liberación de citocinas; y

CRES representa síndrome de encefalopatía relacionada con células CAR-T.

REIVINDICACIONES

1. Receptor de antígeno quimérico, en el que la secuencia de aminoácidos del receptor de antígeno quimérico se muestra en la SEQ ID NO. 1.
2. Molécula de ácido nucleico aislada, que codifica el receptor de antígeno quimérico según la reivindicación 1.
3. Molécula de ácido nucleico aislada, que codifica un receptor de antígeno quimérico, en la que la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico que se muestra en SEQ ID NO. 2.
4. Vector que comprende la molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2-3.
5. Célula efectora inmunitaria, que comprende el receptor de antígeno quimérico, según la reivindicación 1, la molécula de ácido nucleico, según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, y/o el vector según la reivindicación 4.
6. Célula efectora inmunitaria, según la reivindicación 5, en la que la célula efectora inmunitaria se selecciona del grupo que consiste en un linfocito T y una célula asesina natural.
7. Célula efectora inmunitaria, según cualquiera de las reivindicaciones 5-6, en la que el receptor de antígeno quimérico, según la reivindicación 1, se expresa en la superficie de la célula efectora inmunitaria.
8. Procedimiento *in vitro* para preparar una célula efectora inmunitaria, que comprende la etapa de transducir el vector, según la reivindicación 4, en una célula efectora inmunitaria; preferiblemente, en el que la célula efectora inmunitaria se selecciona del grupo que consiste en un linfocito T y una célula asesina natural.
9. Composición que comprende la célula efectora inmunitaria, según cualquiera de las reivindicaciones 5-7.
10. Receptor de antígeno quimérico, según la reivindicación 1, la molécula de ácido nucleico, según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, el vector, según la reivindicación 4, y/o la célula efectora inmunitaria, según cualquiera de las reivindicaciones 5-7, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de CD19.
11. Receptor de antígeno quimérico, la molécula de ácido nucleico, el vector y/o la célula efectora inmunitaria para su uso, según la reivindicación 10, en donde la enfermedad o trastorno asociado con la expresión de CD19 comprende tumores no sólidos; preferiblemente en donde el tumor no sólido comprende leucemia y/o linfoma.
12. Receptor de antígeno quimérico, la molécula de ácido nucleico, el vector y/o la célula efectora inmunitaria para su uso, según la reivindicación 10, en donde la enfermedad o trastorno asociado con la expresión de CD19 comprende leucemia linfoblástica aguda y/o linfoma de células B; preferiblemente, en donde la leucemia linfoblástica aguda comprende leucemia linfoblástica aguda en adultos y/o leucemia linfoblástica aguda en niños.
13. Receptor de antígeno quimérico, la molécula de ácido nucleico, el vector y/o la célula efectora inmunitaria para su uso, según la reivindicación 12, en donde la administración se realiza a una dosis de $0,25 \times 10^8$ a $0,5 \times 10^8$ células T CAR-positivas.
14. Receptor de antígeno quimérico, la molécula de ácido nucleico, el vector y/o la célula efectora inmunitaria para su uso, según la reivindicación 12, en donde el linfoma de células B comprende linfoma no Hodgkin.
15. Receptor de antígeno quimérico, la molécula de ácido nucleico, el vector y/o la célula efectora inmunitaria para su uso, según la reivindicación 14, en donde la administración se realiza a una dosis de 1×10^8 a 2×10^8 células T CAR-positivas.

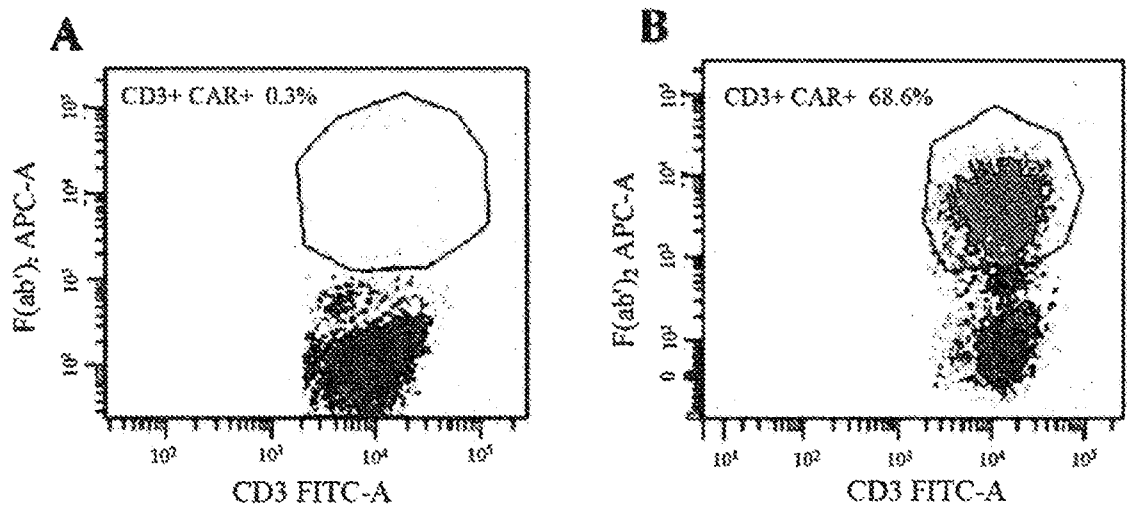


Figura 1

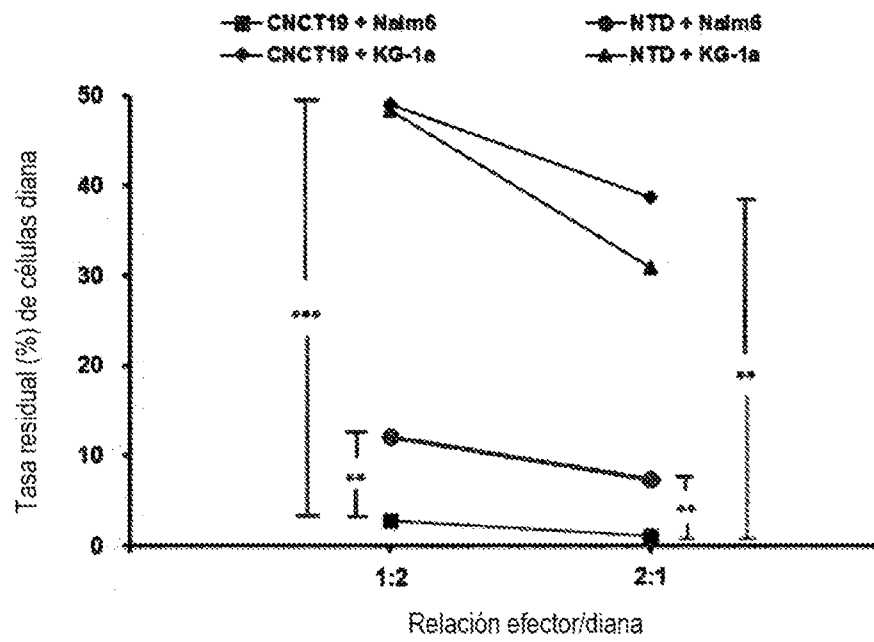


Figura 2

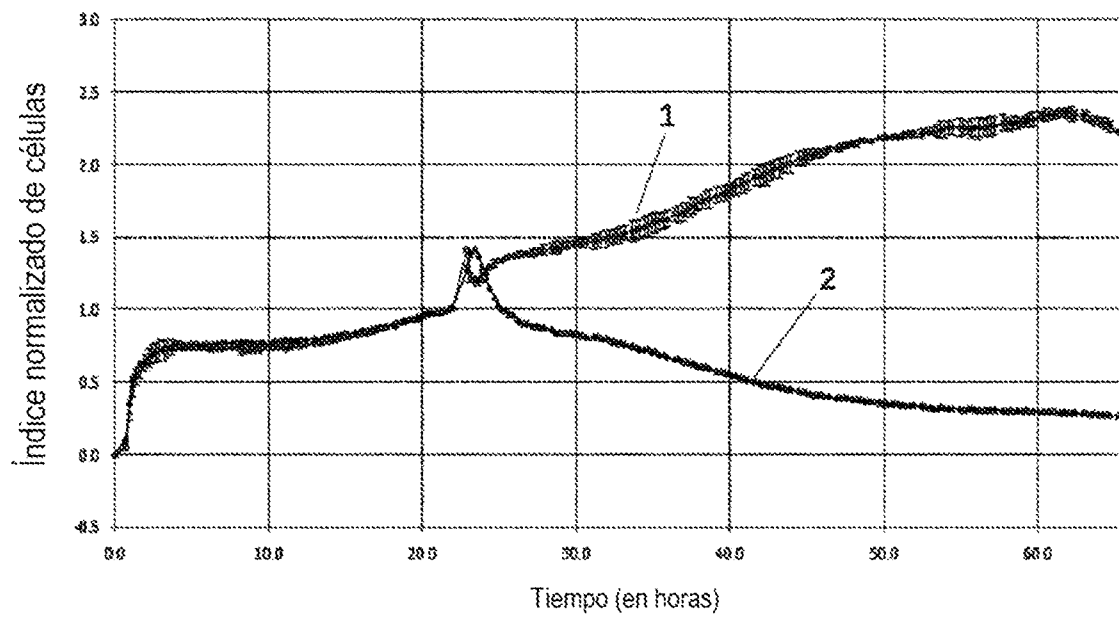


Figura 3

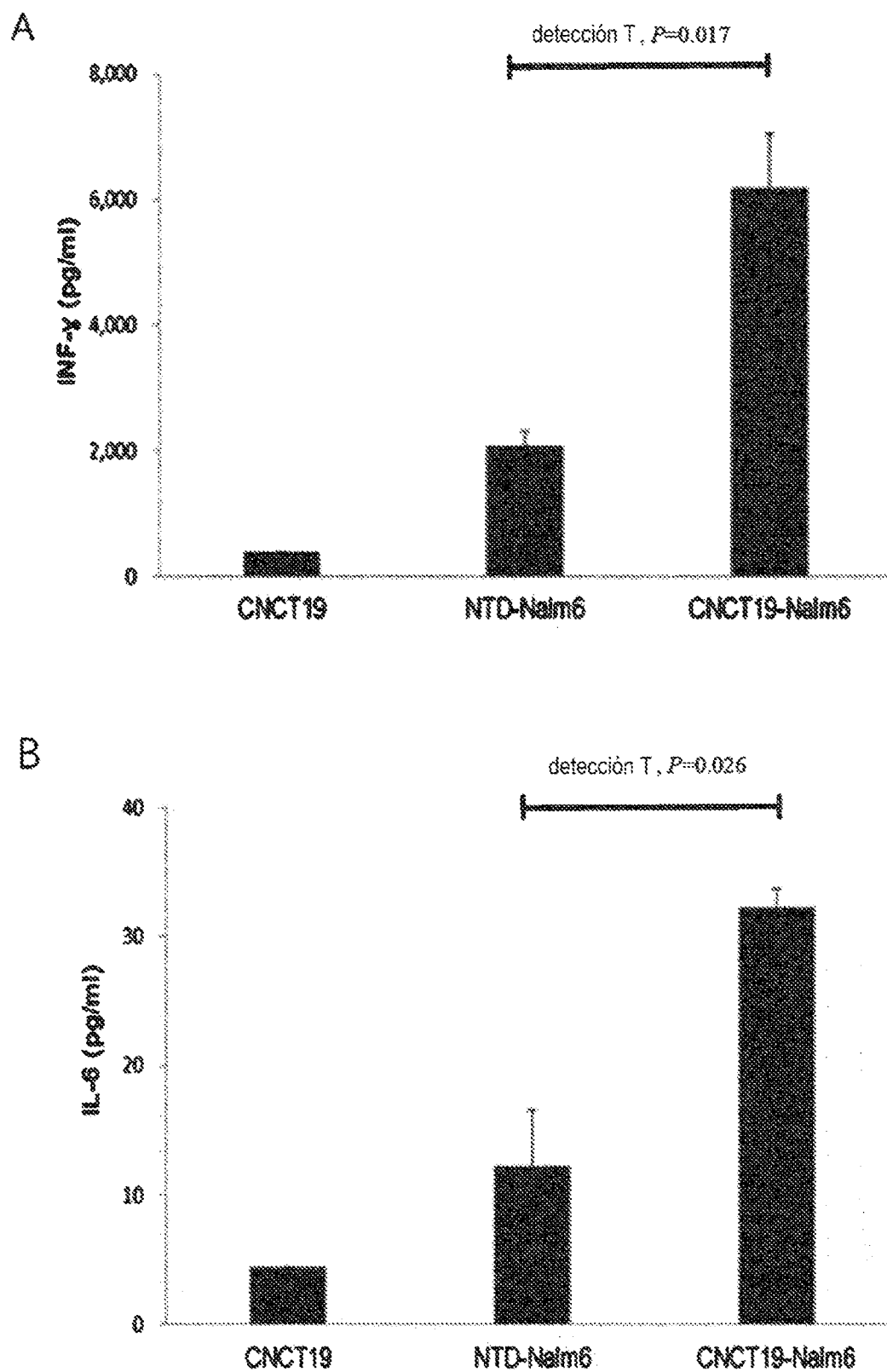


Figura 4

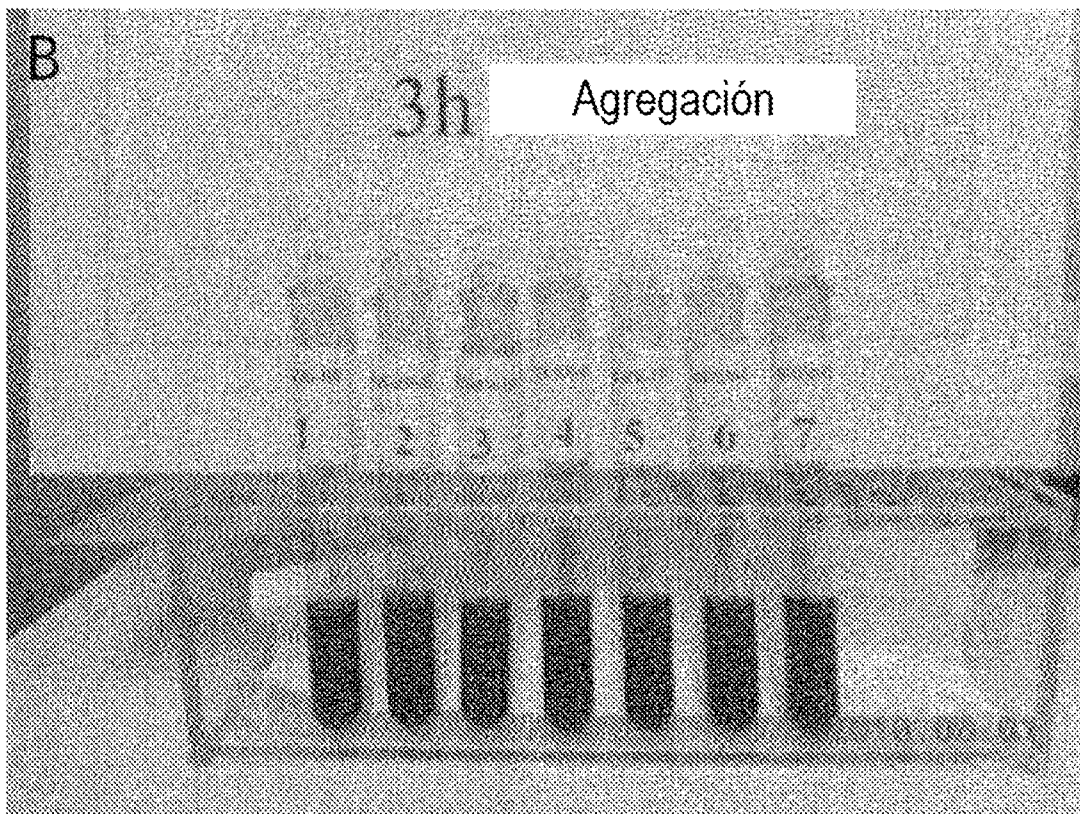
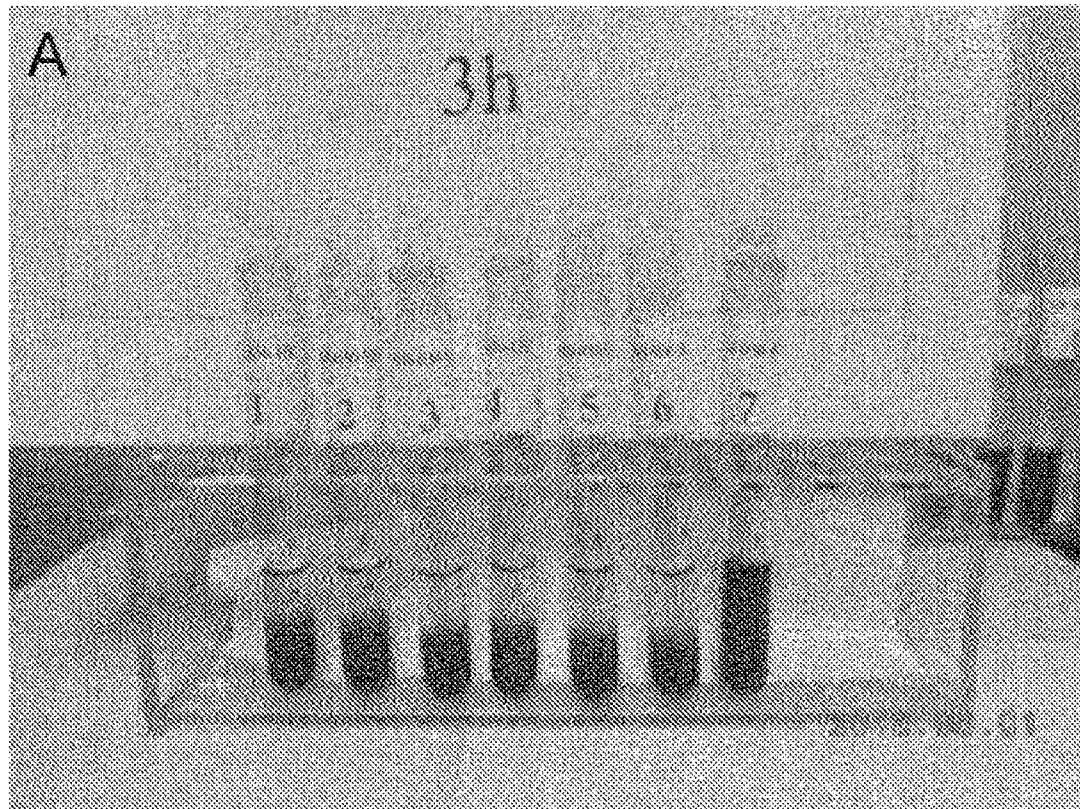
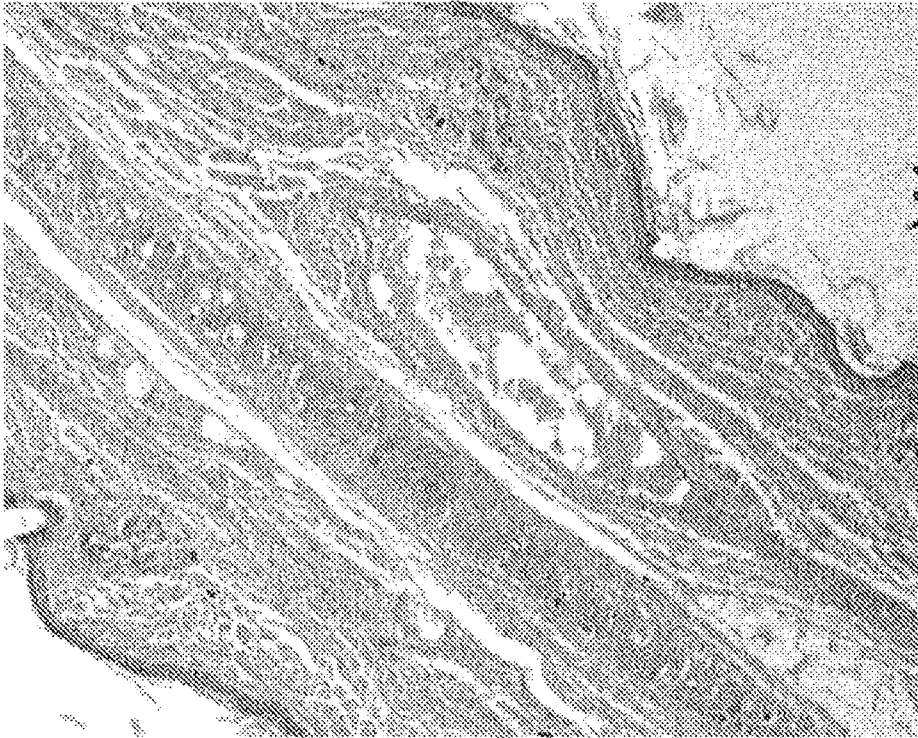


Figura 5

A



B

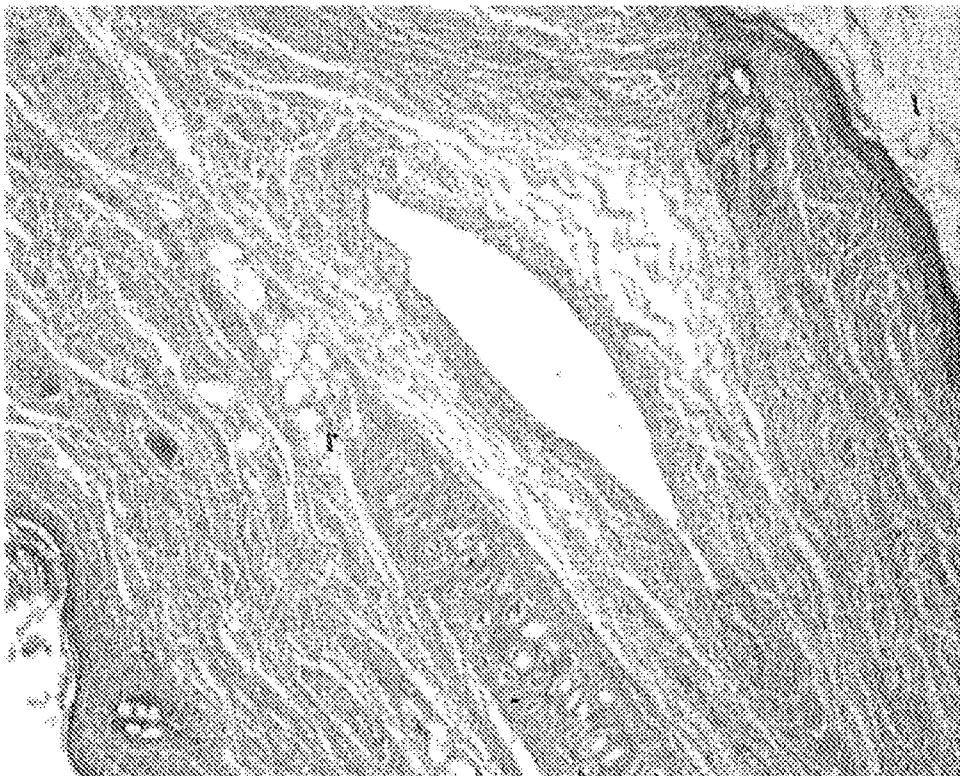


Figura 6

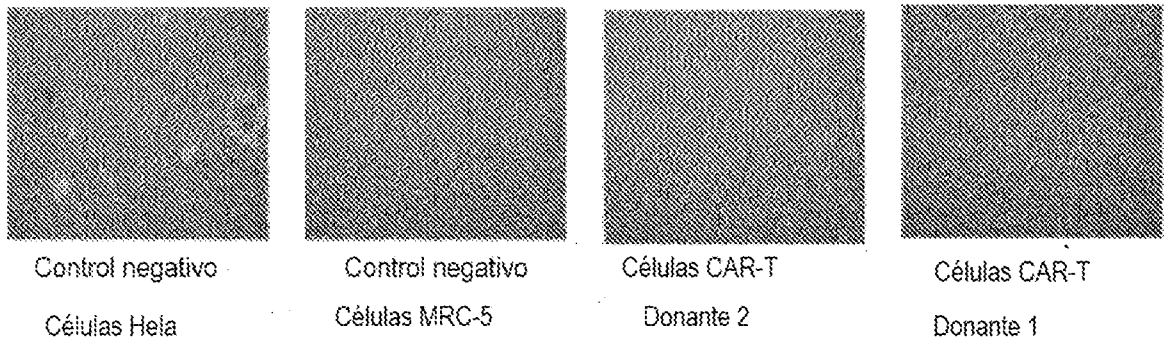


Figura 7

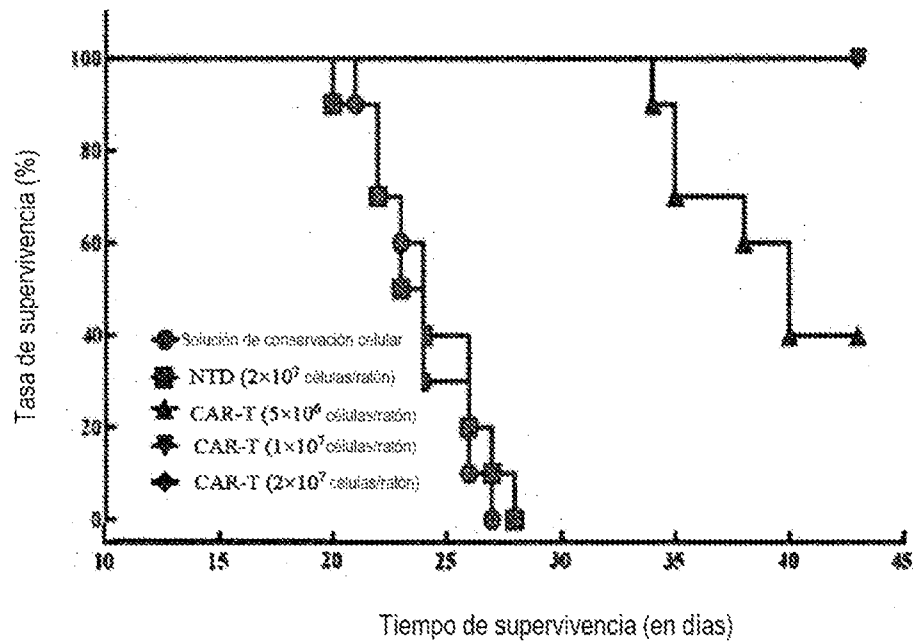


Figura 8

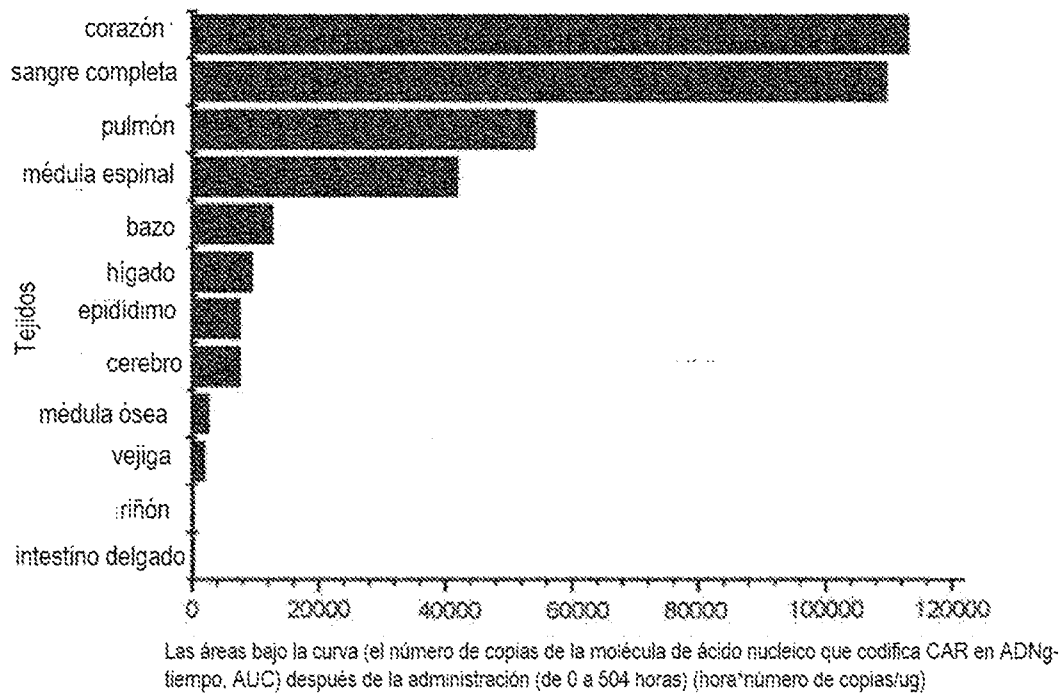


Figura 9

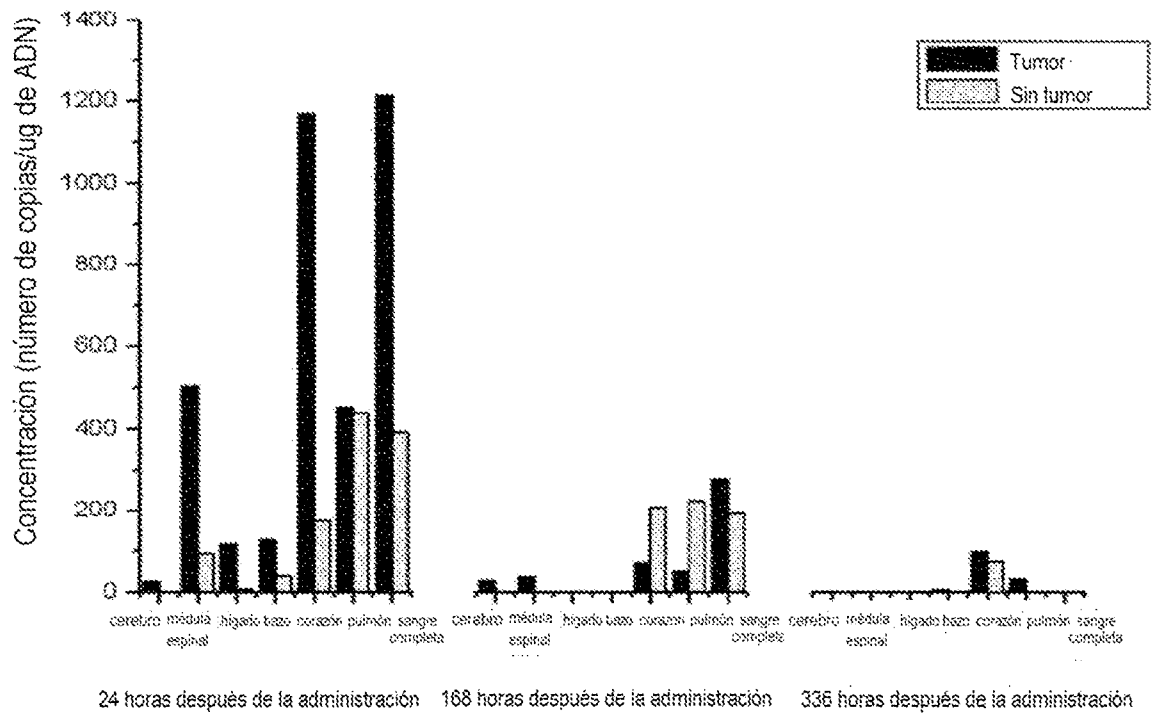


Figura 10

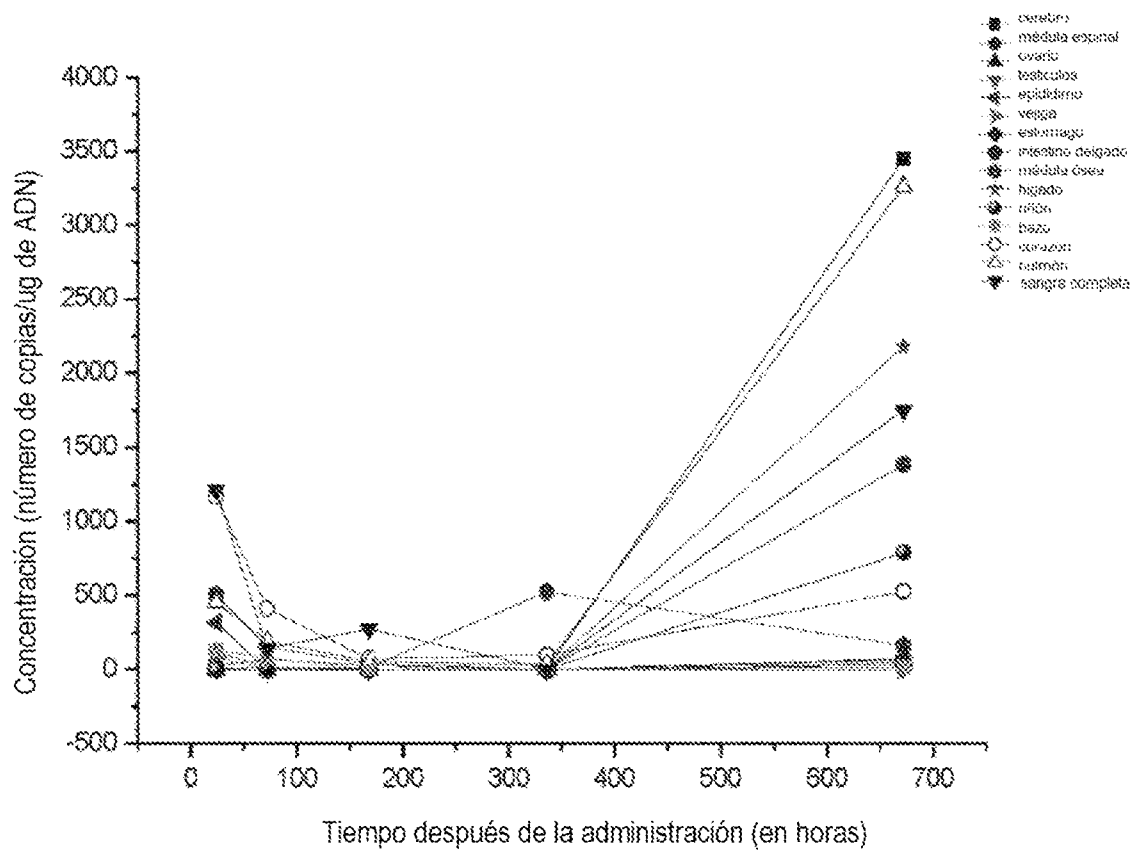


Figura 11