

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 957**

51 Int. Cl.:

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2016** **PCT/US2016/063700**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.06.2017** **WO17091786**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2016** **E 16810200 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024** **EP 3380620**

54 Título: **Vectores de transferencia lentivirales optimizados y usos de los mismos**

30 Prioridad:

23.11.2015 US 201562258798 P

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

18.11.2024

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (50.0%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel, CH y

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

SLEPUSHKIN, VLADIMIR y

LUKASHEV, DMITRIY

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 2 987 957 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

Vectores de transferencia lentivirales optimizados y usos de los mismos

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a vectores de transferencia lentivirales y procedimientos para utilizar dichos vectores.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La expresión de genes heterólogos en células es deseable para muchas aplicaciones terapéuticamente relevantes. Un procedimiento para introducir un gen heterólogo en una célula implica el uso de vectores de transferencia que, cuando se transfectan en una célula huésped, inducen a la célula huésped a producir partículas virales que incluyen el gen heterólogo. Las partículas virales pueden usarse entonces para infectar una célula diana, induciendo de ese modo a que la célula diana exprese el gen heterólogo. Los virus útiles en dichos procedimientos incluyen lentivirus, adenovirus y virus adenoasociados. Algunos vectores lentivirales existentes exhiben niveles bajos de expresión génica y pueden ser extremadamente grandes. Además, puede haber problemas de bioseguridad y toxicidad con respecto a dichos vectores. Por tanto, la transfección y la producción viral utilizando dichos vectores pueden ser lentas, ineficientes, laboriosas y costosas. Por lo tanto, existe una necesidad de vectores lentivirales mejorados adecuados para la producción rápida y eficiente de virus que sean útiles para inducir la expresión de genes heterólogos en células diana.

[0003] Dull et al., 1998, Journal of Virology 72: 8463-8471, describe un vector lentivirus de tercera generación con un sistema de empaquetamiento condicional. Schneider et al., 1997, Journal of Virology, 71: 4892-4903, describe que la inactivación de los elementos inhibidores del VIH tipo 1 permite la expresión independiente de rev de gag y gag/proteasa y la formación de partículas. Lima et al., 2011, Thrombosis and Haemostasis, vol. 106, n.º 4, págs. 712-723 describe que la transformación maligna en los melanocitos está asociada con una mayor producción de microvesículas procoagulantes. Chen et al., 2015, Medical Science Monitor, 21: 2110-2115 se refiere a la construcción de células T modificadas genéticamente recombinantes con el anticuerpo de cadena única CD28-CD137-TCRζ anti-CD20 y su efecto terapéutico en el linfoma de células B. Milone et al., 2009, Molecular therapy, 17: 1453-1464 describe que los receptores quiméricos que contienen dominios de transducción de señales CD137 median en una mayor supervivencia de las células T y una mayor eficacia antileucémica in vivo. El documento WO 2015/164759 A2 se refiere a receptores de antígenos quiméricos del promotor MND. Koldej y Anson, 2009, BMC Biotechnology, 9: 86, da a conocer el refinamiento del vector lentiviral para un procesamiento mejorado del ARN y tasas reducidas de reparación por inactivación selectiva.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

[0004] La presente invención da a conocer un vector de transferencia lentiviral que comprende las siguientes características en asociación operativa: (a) un promotor de citomegalovirus (CMV) que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 52; (b) una región R de LTR que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 53; (c) una región U5 de LTR que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 54; (d) un sitio de unión a cebador que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 55; (e) una señal de empaquetamiento (psi) que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 56; (f) un sitio donante de empalme principal que comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 57, que está dentro de dicha señal de empaquetamiento; (g) un polinucleótido que codifica al menos una parte de una proteína gag, en el que el polinucleótido comprende una secuencia inhibidora de INS1 mutada que reduce la restricción de la exportación nuclear de ARN con respecto a INS1 de tipo salvaje del aislado de VIH-1 NL4-3 o SF3, en el que dicho polinucleótido es una secuencia de gag parcial que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 58; (h) una secuencia de env parcial que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 60; (i) un elemento sensible a rev que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 62; (j) una secuencia de env parcial que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 64; (k) un sitio aceptor de empalme que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 65, que está dentro de dicha secuencia de env parcial de la parte (j); (l) un tracto central de polipurina (cPPT) que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con las SEQ ID NO: 67, 92 o 93; (m) un sitio aceptor de empalme que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con las SEQ ID NO: 68 o 94, que está dentro de dicho tracto central de polipurina; (n) un promotor alfa de EF1 que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 71 o 95; (o) un sitio donador de empalme constitutivo (CD) que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 72, que está dentro de dicho promotor alfa de EF1; (p) un sitio aceptor de empalme constitutivo (CA) que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 73, que está dentro de dicho promotor alfa de EF1; (q) una secuencia de ácido nucleico heteróloga que (i) codifica un EGFP y comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 76,

y/o (ii) comprende una secuencia de transgén; (r) una secuencia de elemento regulador postranscripcional (PRE) que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 78 o 79; (s) una secuencia de nef parcial que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 83; (t) una secuencia de dU3 que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 84; (u) una región R de LTR que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 85; y (v) una región U5 de LTR que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 86;

en el que el vector de transferencia lentiviral no comprende: (1) un polinucleótido que codifica las secuencias inhibitoras INS2, INS3 e INS4 de gag; y (2) un origen de replicación SV40 y/o un origen de replicación f1.

[0005] La presente invención también da a conocer una célula huésped que comprende la transferencia lentiviral de la presente invención.

[0006] La presente invención también da a conocer una composición que comprende un vector de transferencia lentiviral de la presente invención y uno o más vectores de empaquetamiento.

[0007] La presente invención también da a conocer un procedimiento para producir un lentivirus capaz de expresar una secuencia de ácido nucleico heterólogo, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) introducir en una célula, por ejemplo, una célula 293T, una célula T Jurkat o una célula T humana primaria:

(i) el vector de transferencia lentiviral de la presente invención, y

(ii) uno o más vectores de empaquetamiento lentiviral; y

(b) expresar proteínas virales codificadas por dicho vector de transferencia lentiviral y/o dicho vector de empaquetamiento en dicha célula, produciendo de este modo un lentivirus que comprende la secuencia de ácido nucleico heterólogo de dicho vector de transferencia lentiviral.

[0008] Estas y otras realizaciones de la presente invención se establecen en las reivindicaciones adjuntas .

DESCRIPCION DETALLADA

[0009] La información técnica que se expone a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá del alcance de la presente invención, que se define exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas. La información técnica adicional se proporciona para situar la invención real en un contexto técnico más amplio y para ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados.

[0010] Además, las referencias incidentales a procedimientos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia y procedimientos de diagnóstico practicados en el cuerpo humano o animal no deben interpretarse como una reivindicación de protección para dicho procedimiento como tal, sino que deben interpretarse como una referencia a productos, en particular sustancias o composiciones, para su uso en cualquiera de estos procedimientos.

[0011] En un primer aspecto, la presente invención da a conocer vectores de transferencia lentivirales según se define en las reivindicaciones. Los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención incluyen una o más secuencias de ácido nucleico heterólogas (que están de manera opcional en dirección 3' de una secuencia Kozak), y se caracterizan por las siguientes características: (a) incluyen un promotor de citomegalovirus (CMV), (b) incluyen un polinucleótido que codifica al menos una parte de una proteína gag que incluye una secuencia inhibitora de INS1 mutada que reduce la restricción de la exportación nuclear de ARN en relación con INS1 de tipo salvaje, (c) no incluyen un polinucleótido que codifica las secuencias inhibitoras de INS2, INS3 e INS4 de gag, y (d) no incluyen un origen de replicación SV40 y/o un origen de replicación f1. En los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención, el promotor de CMV comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 52. En los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención, el polinucleótido que codifica al menos una parte de una proteína gag comprende una secuencia inhibitora de INS1 mutada que reduce la restricción de la exportación nuclear de ARN en relación con INS1 de tipo salvaje del aislado NL4-3 o SF3 del VIH-1, en donde dicho polinucleótido es una secuencia de gag parcial que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 58.

[0012] En diversos ejemplos, la transferencia lentiviral incluye un polinucleótido que codifica una parte de 150-250 (por ejemplo, 168) nucleótidos de una proteína gag que (i) incluye una secuencia inhibitora de INS1 mutada que reduce la restricción de la exportación nuclear de ARN en relación con INS1 de tipo salvaje, y/o (ii) contiene la inserción de dos nucleótidos que da como resultado un cambio de marco y una terminación prematura. El vector de transferencia lentiviral de la presente invención no incluye secuencias inhibitoras de INS2, INS3 e INS4 de gag.

[0013] El vector de transferencia lentiviral incluye uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en una señal de empaquetamiento (psi), una secuencia de gag parcial adyacente a psi o parcialmente superpuesta a la misma, un elemento sensible a rev, una secuencia de env parcial y una secuencia cPPT de pol, cuyas secuencias se originan de manera opcional a partir del aislado de VIH-1 NL4-3 o SF3. En diversos ejemplos, la secuencia de cPPT incluye

aproximadamente 150-250 (por ejemplo, 178-181) nucleótidos e incluye la secuencia aceptora de empalme SA1. Los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención incluyen una señal de empaquetamiento (psi) que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 56. Los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención incluyen un elemento sensible a rev que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 62. Los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención incluyen una secuencia de env parcial que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 64. Los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención incluyen una secuencia de cPPT que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 67, 92 o 93.

[0014] Los vectores de transferencia lentivirales pueden incluir de manera opcional uno o más sitios de restricción posicionados entre elementos del vector (ver, por ejemplo, las Tablas 3-5 a continuación para ubicaciones de ejemplo).

[0015] Además, los vectores de transferencia lentivirales incluyen un elemento regulador postranscripcional (PRE). En los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención, la secuencia de PRE comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 78 o 79. Por ejemplo, un PRE del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE); que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 78, o un PRE de aislado del virus de la hepatitis B bba6 (HPRE); que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 79, y de manera opcional en donde el HPRE incluye una mutación inactivadora en una secuencia que codifica la proteína X.

[0016] Los vectores de transferencia lentivirales pueden incluir además un promotor subgenómico que se puede utilizar para impulsar la expresión de un transgén. Los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención comprenden un promotor EF1 alfa que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 71 o 95. En un ejemplo, el promotor es un promotor EF1a que tiene una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 71. Los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención comprenden un sitio donante de empalme constitutivo (CD) que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 72, que está dentro de dicho promotor EF1alfa; y un sitio aceptor de empalme constitutivo (CA) que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 73, que está dentro de dicho promotor EF1alfa. El promotor EF1a de manera opcional tiene longitud completa e incluye secuencias donantes yceptoras de empalme intactas (SEQ ID NO: 72 y 73, respectivamente) (ver, por ejemplo, SEQ ID NO: 95).

[0017] Los componentes lentivirales de los vectores de transferencia lentivirales de manera opcional pueden tener su origen en el VIH-1 (por ejemplo, la cepa NL4-3 o SF3 del VIH-1). En diversas realizaciones, en los vectores de transferencia lentivirales, la secuencia que codifica la proteína gag parcial tiene menos del 90 % de identidad de secuencia con una región correspondiente de la proteína gag codificada por un plásmido de empaquetamiento utilizado con el vector de transferencia lentiviral (por ejemplo, el plásmido de empaquetamiento pMDLgprRE).

[0018] La presente invención incluye vectores de transferencia lentivirales que incluyen las siguientes características: (i) un promotor de CMV que incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 52, (ii) una región R de LTR que incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 53, (iii) una región U5 de LTR que incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 54, (iv) un sitio de unión a cebador que incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 55, (v) una señal de empaquetamiento que incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 56, (vi) un sitio donante de empalme principal que comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 57, que está dentro de la señal de empaquetamiento, (vii) una secuencia de gag parcial que incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 58, (viii) una secuencia de env parcial que incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 60, (ix) un elemento sensible a rev que incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 62, (x) una secuencia de env parcial que incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 64, (xi) un sitio aceptor de empalme que incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 65, que está dentro de la secuencia de env parcial de la parte (x), (xii) un tracto central de polipurina que incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con las SEQ ID NO: 67, 92 o 93, (xiii) un sitio aceptor de empalme que incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con las SEQ ID NO: 68 o 94, que está dentro del tracto central de polipurina, (xiv) un promotor EF1alfa que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 71 o 95, (xv) un sitio donante de empalme constitutivo (CD) que incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 72, que está dentro del promotor EF1alfa, (xvi) un sitio aceptor de empalme constitutivo (CA) que incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 73, que está dentro del promotor EF1alfa, (xvii) una secuencia de ácido nucleico heteróloga (i) que codifica una EGFP que incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 76 y/o (ii) que comprende una secuencia de transgén, (xviii) una secuencia de PRE que incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 78 o 79, (xix) una secuencia de nef parcial que incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID

NO: 83, (xx) una secuencia de dU3 que incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 84, (xxi) una región R de LTR que incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 85, y (xxii) una región U5 de LTR que incluye una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 86. Las identidades de secuencia de estos componentes pueden ser de manera opcional del 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

[0019] Los vectores de transferencia lentiviral de la presente invención no comprenden: (1) un polinucleótido que codifica las secuencias inhibitoras INS2, INS3 e INS4 de gag; ni (2) un origen de replicación SV40 y/o un origen de replicación f1.

[0020] Los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención incluyen una secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica una proteína, por ejemplo, EGFP y/o un receptor de antígeno quimérico (CAR, *Chimeric Antigen Receptor*). En el caso de un CAR, el CAR puede incluir de manera opcional, en una dirección N-terminal a C-terminal, un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, un scFv), un dominio transmembrana y uno o más dominios de señalización (por ejemplo, uno o más dominios de señalización primarios (por ejemplo, un dominio estimulador CD3-zeta) y/o uno o más dominios de señalización coestimuladores (por ejemplo, un dominio intracelular seleccionado entre una proteína coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, ICAM-1, antígeno asociado a la función linfocítica-1 (LFA-1), CD2, CD7, CD287, LIGHT, NKG2C, NKG2D, SLAMF7, NKp80, NKp30, NKp44, NKp46, CD160, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83)).

[0021] En varios ejemplos, el dominio de unión a antígeno se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1; molécula 1 similar a lectina de tipo C, CD33; variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII); gangliósido G2 (GD2); gangliósido GD3; antígeno de maduración de células B (BCMA) miembro de la familia del receptor de TNF; antígeno Tn ((Tn Ag) o (GalNAc-Ser/Thr)); antígeno de membrana específico de próstata (PSMA); receptor huérfano 1 de tipo receptor de tirosina quinasa (ROR1); tirosina quinasa de tipo Fms 3 (FLT3); glucoproteína 72 asociada a tumores (TAG72); CD38; CD44v6; antígeno carcinoembrionario (CEA); molécula de adhesión de células epiteliales (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); Subunidad alfa-2 del receptor de interleucina-13; mesotelina; receptor alfa de interleucina 11 (IL-11Ra); antígeno de células madre prostáticas (PSCA); serina proteasa 21; receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2); antígeno de Lewis(Y); CD24; receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-beta); antígeno embrionario 4 específico de estadio (SSEA-4); CD20; receptor alfa de folato; receptor de proteína tirosina quinasa ERBB2 (Her2/neu); mucina 1, asociada a la superficie celular (MUC1); receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); molécula de adhesión celular neural (NCAM); prostasa; fosfatasa ácida prostática (PAP); factor de elongación 2 mutado (ELF2M); efrina B2; proteína alfa de activación de fibroblastos (FAP); receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (receptor de IGF-I), anhidrasa carbónica IX (CAIX); subunidad del proteasoma (prosome, macropáina), tipo beta, 9 (LMP2); glicoproteína 100 (gp100); proteína de fusión de oncogén que consiste en la región de agrupación de puntos de ruptura (BCR) y el homólogo 1 del oncogén viral de leucemia murina de Abelson (Abl) (bcr-abl); tirosinasa; receptor 2 de efrina tipo A (EphA2); fucosil GM1; molécula de adhesión de sialil Lewis (sLe); gangliósido GM3; transglutaminasa 5 (TGS5); antígeno asociado al melanoma de alto peso molecular (HMWMAA); gangliósido o-acetil-GD2 (OAcGD2); receptor beta de folato; marcador 1 de células endoteliales tumorales (TEM1/CD248); proteína relacionada con el marcador 7 de células endoteliales tumorales (TEM7R); claudina 6 (CLDN6); receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR); receptor acoplado a proteína G, clase C, grupo 5, miembro D (GPRC5D); marco de lectura abierto 61 del cromosoma X (CXORF61); CD97; CD179a; quinasa del linfoma anaplásico (ALK); ácido polisialico; proteína específica de placenta 1 (PLAC1); parte hexasacárida de la gliceramida globoH (GloboH); antígeno de diferenciación de la glándula mamaria (NY-BR-1); uroplaquina 2 (UPK2); receptor celular 1 del virus de la hepatitis A (HAVCR1); adrenoceptor beta 3 (ADRB3); panexina 3 (PANX3); receptor 20 acoplado a proteína G (GPR20); complejo 6 de antígeno linfocítico, locus K 9 (LY6K); receptor olfativo 51E2 (OR51E2); proteína de marco de lectura alternativo de TCR gamma (TARP); proteína del tumor de Wilms (WT1); Antígeno 1 de cáncer de testículo (NY-ESO-1); Antígeno 2 de cáncer de testículo (LAGE-1a); Antígeno 1 asociado al melanoma (MAGE-A1); gen 6 de la variante de translocación de ETS, ubicado en el cromosoma 12p (ETV6-AML); Proteína espermática 17 (SPA17); Familia de antígenos X, Miembro 1A (XAGE1); receptor de superficie celular de unión a angiopoyetina 2 (Tie 2); antígeno 1 de cáncer de testículo derivado de melanoma (MAD-CT-1); antígeno 2 de cáncer de testículo derivado de melanoma (MAD-CT-2); antígeno relacionado con Fos 1; proteína tumoral p53 (p53); mutante p53; proteína; superviviente; telomerasa; antígeno tumoral 1 de carcinoma de próstata, antígeno de melanoma reconocido por células T 1; mutante de sarcoma de rata (Ras); telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT); puntos de corte de translocación del sarcoma; inhibidor de apoptosis de melanoma (ML-IAP); ERG (proteasa transmembrana, serina 2 (TMPRSS2), gen de fusión de ETS; N-acetil glucosaminil-transferasa V (NA17); proteína de caja pareada Pax-3 (PAX3); receptor de andrógenos; ciclina B1; homólogo derivado del neuroblastoma del oncogén viral de mielocitomatosis aviar v-myc (MYCN); miembro C de la familia de homólogos de Ras (RhoC); proteína 2 relacionada con la tirosinasa (TRP-2); citocromo P450 1B1 (CYP1B1); antígeno 3 de carcinoma de células escamosas similar al factor de unión a CCCTC (proteína de dedo de zinc) reconocido por células T (SART3); proteína de caja emparejada Pax-5 (PAX5); proteína de unión a proacrosina sp32 (OY-TES1); proteína tirosina quinasa específica de linfocitos (LCK); proteína de anclaje de quinasa A 4 (AKAP-4); sarcoma sinovial, punto de corte X 2 (SSX2); receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE-1); renal ubicuo 1 (RU1); renal ubicuo 2 (RU2); legumain; virus del papiloma humano E6 (HPV E6); virus del papiloma humano E7 (HPV E7); carboxil esterasa intestinal; proteína de

choque térmico 70-2 mutada (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; receptor tipo inmunoglobulina asociada a leucocitos 1 (LAIR1); fragmento Fc del receptor de IgA (FCAR o CD89); miembro 2 de la subfamilia A de receptores de tipo inmunoglobulina leucocitaria (LILRA2); miembro f de la familia de moléculas similares a CD300 (CD300LF); miembro A de la familia 12 del dominio de lectina de tipo C (CLEC12A); antígeno 2 de células estromales de la médula ósea (BST2); receptor de hormona 2 similar a mucina que contiene módulo de tipo EGF (EMR2); antígeno linfocítico 75 (LY75); glipicano-3 (GPC3); proteína 5 de tipo receptor Fc (FCRL5); y polipéptido 1 de tipo inmunoglobulina lambda 1 (IGLL1).

[0022] En un ejemplo específico, el CAR incluye un anticuerpo anti-CD19 o un fragmento del mismo, un dominio transmembrana 4-1BB (CD137) y un dominio de señalización CD3-zeta.

[0023] Los vectores lentivirales de la presente invención comprenden los elementos en asociación operativa como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, los vectores de transferencia lentivirales incluyen, de 5' a 3', uno o más (por ejemplo, todos) de los siguientes elementos en asociación operativa: un promotor, una señal de empaquetamiento (psi) que incluye un sitio donante de empalme principal (SD), una secuencia de gag parcial, una secuencia de env parcial, un elemento sensible a Rev (RRE), una secuencia de env parcial que incluye un sitio aceptor de empalme (SA7), un tracto central de polipurina (cPPT) que incluye un sitio aceptor de empalme (SA1), un promotor EF1a, que comprende un sitio donante de empalme constitutivo (CD) y un sitio aceptor de empalme constitutivo (CD), de manera opcional un gen que codifica EGFP y/o una secuencia de ácido nucleico heterólogo, y un elemento regulador postranscripcional.

[0024] Los vectores lentivirales de la presente invención comprenden los elementos en asociación operativa como se define en las reivindicaciones. En un ejemplo, el vector de transferencia lentiviral incluye, de 5' a 3', uno o más de los siguientes elementos en asociación operativa: un promotor de CMV, una región R de LTR, una región U5 de LTR, un sitio de unión del cebador (PBS), una señal de empaquetamiento (psi) que incluye un sitio donante de empalme principal (SD), una secuencia de gag parcial, una secuencia de env parcial, un elemento sensible a Rev (RRE), una secuencia de env parcial que incluye un sitio aceptor de empalme (SA7), un tracto central de polipurina (cPPT) que incluye un sitio aceptor de empalme (SA1), un promotor EF1a, de manera opcional un gen que codifica EGFP y/o una secuencia de ácido nucleico heterólogo, un elemento regulador postranscripcional, una región R de LTR, una región U5 de LTR, una cola de poliA SV40, un gen de resistencia a la kanamicina (nptII) y un origen de replicación pUC.

[0025] En varios ejemplos, el elemento regulador postranscripcional es un PRE del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) o un PRE del aislado del virus de la hepatitis B bba6 (HPRE), tal como se describe en el presente documento.

[0026] En otros ejemplos, la secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), tal como se describe en el presente documento. En un ejemplo, el CAR puede incluir un anticuerpo anti-CD19 o un fragmento del mismo, un dominio transmembrana 4-1BB (CD137) y un dominio de señalización CD3-zeta.

[0027] En otro aspecto, la presente invención incluye una célula huésped (por ejemplo, una célula 293T, una célula T Jurkat o una célula T humana primaria) que incluye un vector de transferencia lentiviral de la presente invención. De manera opcional, la célula huésped puede incluir además uno o más vectores de empaquetamiento lentivirales.

[0028] En un aspecto adicional, la presente invención incluye composiciones que incluyen un vector de transferencia lentiviral de la presente invención y uno o más vectores de empaquetamiento.

[0029] En un aspecto adicional, la presente invención incluye procedimientos para producir un lentivirus capaz de expresar una secuencia de ácido nucleico heteróloga. Estos procedimientos pueden incluir de manera opcional (a) introducir en una célula (por ejemplo, una célula 293T, una célula T Jurkat o una célula T humana primaria): (i) un vector de transferencia lentiviral de la presente invención, y (ii) uno o más vectores de empaquetamiento lentivirales; y (b) expresar proteínas virales codificadas por el vector de transferencia lentiviral y/o el vector de empaquetamiento en la célula, produciendo de ese modo un lentivirus que incluye la secuencia de ácido nucleico heteróloga del vector de transferencia lentiviral.

Definiciones

[0030] El término "Receptor de Antígeno Quimérico" o alternativamente un "CAR" se refiere a un conjunto de polipéptidos, típicamente dos en las realizaciones más simples, que, cuando se encuentra en una célula efectora inmunitaria, proporciona a la célula especificidad para una célula diana, típicamente una célula cancerosa, y generación de señal intracelular. En algunas realizaciones, un CAR comprende al menos un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización citoplasmática (también denominado en el presente documento "un dominio de señalización intracelular") que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora y/o molécula coestimuladora, tal como se define a continuación. En algunos aspectos, el conjunto de polipéptidos son contiguos entre sí. En algunas realizaciones, el conjunto de polipéptidos incluye un interruptor de dimerización que, ante la presencia de una molécula de dimerización, puede acoplar los polipéptidos entre sí, por ejemplo, puede acoplar un dominio de unión a antígeno a un dominio de señalización intracelular. En un aspecto, la molécula estimuladora es la cadena zeta asociada con el complejo del

receptor de células T. En un aspecto, el dominio de señalización citoplasmática comprende además uno o más dominios de señalización funcionales derivados de al menos una molécula coestimuladora, tal como se define a continuación. En un aspecto, la molécula coestimuladora se elige entre las moléculas coestimuladoras descritas en el presente documento, por ejemplo, 4-1BB (es decir, CD137), CD27 y/o CD28. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula coestimuladora y un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende dos dominios de señalización funcionales derivados de una o más moléculas coestimuladoras y un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende al menos dos dominios de señalización funcionales derivados de una o más moléculas coestimuladoras y un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora. En un aspecto, el CAR comprende una secuencia líder opcional en el extremo amino (N-ter) de la proteína de fusión CAR. En un aspecto, el CAR comprende además una secuencia líder en el extremo N-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular, en donde la secuencia líder se escinde de manera opcional del dominio de unión a antígeno (por ejemplo, un scFv) durante el procesamiento celular y la localización del CAR en la membrana celular.

[0031] Un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, un scFv o TCR) que se dirige a un marcador tumoral X específico, tal como los descritos en el presente documento, también se denomina XCAR. Por ejemplo, un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno que se dirige a CD19 se denomina CD19CAR.

[0032] El término "dominio de señalización" se refiere a la parte funcional de una proteína que actúa transmitiendo información dentro de la célula para regular la actividad celular a través de vías de señalización definidas generando segundos mensajeros o funcionando como efectores respondiendo a dichos mensajeros.

[0033] El término "anticuerpo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína o secuencia polipeptídica derivada de una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, de cadena múltiple o simple, o inmunoglobulinas intactas, y pueden derivarse de fuentes naturales o de fuentes recombinantes. Los anticuerpos pueden ser tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina.

[0034] El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a al menos una parte de un anticuerpo que conserva la capacidad de interactuar específicamente con (por ejemplo, mediante unión, impedimento estérico, estabilización/desestabilización, distribución espacial) un epítipo de un antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no sin limitarse a los mismos, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, fragmentos de anticuerpo scFv, Fv unidos por disulfuro (sdFv), un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, anticuerpos lineales, anticuerpos de dominio único, tales como sdAb (ya sea VL o VH), dominios VHH de camélidos, anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo, tales como un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra, y un CDR aislado u otros fragmentos de unión a epítipo de un anticuerpo. Un fragmento de unión a antígeno también se puede incorporar en anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, nanocuerpos, intracuerpos, diacuerpos, tricuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005). Los fragmentos de unión a antígeno también se pueden injertar en estructuras ("scaffolds") basadas en polipéptidos, tales como la fibronectina tipo III (Fn3) (ver Patente de Estados Unidos N.º: 6.703.199, que describe los minicuerpos del polipéptido de fibronectina).

[0035] El término "scFv" se refiere a una proteína de fusión que comprende al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena ligera y al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena pesada, en donde las regiones variables de cadena ligera y pesada están unidas de forma contigua, por ejemplo, a través de un enlazador sintético, por ejemplo, un enlazador polipeptídico corto y flexible, y es capaz de ser expresado como un polipéptido de cadena única, y en donde el scFv conserva la especificidad del anticuerpo intacto del cual se deriva. A menos que se especifique, tal como se usa en el presente documento, un scFv puede tener las regiones variables VL y VH en cualquier orden, por ejemplo, con respecto a los extremos N-terminal y C-terminal del polipéptido, el scFv puede comprender VL-enlazador-VH o puede comprender VH-enlazador-VL.

[0036] La parte del CAR que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo puede existir en una variedad de formas donde el dominio de unión al antígeno se expresa como parte de una cadena polipeptídica contigua que incluye, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de dominio único (sdAb), un anticuerpo de cadena única (scFv), un anticuerpo humanizado o un anticuerpo biespecífico (Harlow et al., 1999, en: Using Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, en: Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston y otros, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird y otros, 1988,

Science 242:423-426). En un aspecto, el dominio de unión al antígeno de una composición de CAR comprende un fragmento de anticuerpo. En un aspecto adicional, el CAR comprende un fragmento de anticuerpo que comprende un scFv. Los límites precisos de la secuencia de aminoácidos de un CDR determinado se pueden determinar utilizando cualquiera de varios esquemas bien conocidos, incluidos los descritos por Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5.^a ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD (Esquema de numeración "Kabat") Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948 (esquema de numeración "Chothia"), o una combinación de ambos.

[0037] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "dominio de unión" o "molécula de anticuerpo" se refiere a una proteína, por ejemplo, una cadena de inmunoglobulina o un fragmento de la misma, que comprende al menos una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina. El término "dominio de unión" o "molécula de anticuerpo" abarca anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. En una realización, una molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo multiespecífica, por ejemplo, comprende una pluralidad de secuencias de dominio variable de inmunoglobulina, en donde una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de la pluralidad tiene especificidad de unión para un primer epítipo y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de la pluralidad tiene especificidad de unión para un segundo epítipo. En una realización, una molécula de anticuerpo multiespecífica es una molécula de anticuerpo biespecífica. Un anticuerpo biespecífico tiene especificidad para no más de dos antígenos. Una molécula de anticuerpo biespecífica se caracteriza por una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un primer epítipo y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un segundo epítipo.

[0038] La parte del CAR que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo puede existir en una variedad de formas donde el dominio de unión al antígeno se expresa como parte de una cadena polipeptídica contigua que incluye, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de dominio único (sdAb), un anticuerpo de cadena única (scFv), un anticuerpo humanizado o un anticuerpo biespecífico (Harlow et al., 1999, en: Using antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, en: Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston y otros, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird y otros, 1988, Science 242: 423-426). En un aspecto, el dominio de unión a antígeno de una composición de CAR comprende un fragmento de anticuerpo. En un aspecto adicional, el CAR comprende un fragmento de anticuerpo que comprende un scFv.

[0039] El término "cadena pesada de anticuerpo" se refiere a la más grande de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones naturales, y que normalmente determina la clase a la que pertenece el anticuerpo.

[0040] El término "cadena ligera de anticuerpo" se refiere a la más pequeña de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones naturales. Las cadenas ligeras kappa (κ) y lambda (λ) se refieren a los dos principales isotipos de cadena ligera de anticuerpo.

[0041] El término "anticuerpo recombinante" se refiere a un anticuerpo que se genera utilizando tecnología de ADN recombinante, tal como, por ejemplo, un anticuerpo expresado por un bacteriófago o un sistema de expresión de levadura. El término también debe interpretarse como que significa un anticuerpo que se ha generado mediante la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo y cuya molécula de ADN expresa una proteína de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, en donde la secuencia de ADN o de aminoácidos se ha obtenido utilizando tecnología de secuencia de aminoácidos o ADN recombinante que está disponible y es bien conocida en la técnica.

[0042] El término "antígeno" o "Ag" se refiere a una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar la producción de anticuerpos o la activación de células inmunológicamente competentes específicas, o ambas. El experto en la materia entenderá que cualquier macromolécula, incluidas prácticamente todas las proteínas o péptidos, puede servir como antígeno. Además, los antígenos pueden derivarse de ADN recombinante o genómico. Un experto en la materia entenderá que cualquier ADN que comprenda una secuencia de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos parcial que codifique una proteína que provoque una respuesta inmunitaria codifica, por tanto, un "antígeno" tal como se utiliza dicho término en el presente documento. Además, un experto en la materia entenderá que un antígeno no necesita estar codificado únicamente por una secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen. Es evidente que la presente invención incluye, pero no sin limitarse a los mismos, el uso de secuencias de nucleótidos parciales de más de un gen y que estas secuencias de nucleótidos están dispuestas en varias combinaciones para codificar polipéptidos que provoquen la respuesta inmunitaria deseada. Además, un experto en la materia comprenderá que un antígeno no necesita estar codificado por un "gen". Es evidente que un antígeno puede generarse, sintetizarse o derivarse de una muestra biológica, o puede ser una macromolécula además de un polipéptido. Dicha muestra biológica puede incluir, pero sin limitarse a las mismas, una muestra de tejido, una muestra de tumor, una célula o un fluido con otros componentes biológicos.

[0043] El término "autólogo" se refiere a cualquier material derivado del mismo individuo (por ejemplo, una célula u organismo) al que posteriormente se le va a reintroducir en el individuo. El término "heterólogo" puede referirse a cualquier material derivado de un individuo diferente (por ejemplo, una célula u organismo) que el individuo al que se

le introduce el material. En algunos casos, el término "heterólogo" puede referirse a cualquier material derivado de un individuo (por ejemplo, una célula u organismo) de una especie diferente a la del individuo al que se le introduce el material.

[0044] Un "dominio de señalización intracelular", tal como se utiliza el término en el presente documento, se refiere a una parte intracelular de una molécula. El dominio de señalización intracelular genera una señal que promueve una función efectora inmunitaria de la célula que contiene CAR, por ejemplo, una célula CART. Los ejemplos de función efectora inmunitaria, por ejemplo, en una célula CART, incluyen actividad citolítica y actividad auxiliar, incluida la secreción de citocinas.

[0045] En una realización, el dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización intracelular primario. Los dominios de señalización intracelular primarios de ejemplo incluyen aquellos derivados de las moléculas responsables de la estimulación primaria o la simulación dependiente de antígeno. En una realización, el dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio intracelular coestimulador. Los dominios de señalización intracelular coestimuladores de ejemplo incluyen aquellos derivados de moléculas responsables de señales coestimuladoras o estimulación independiente de antígeno. Por ejemplo, en el caso de un CART, un dominio de señalización intracelular primario puede comprender una secuencia citoplasmática de un receptor de células T, y un dominio de señalización intracelular coestimulador puede comprender una secuencia citoplasmática de un correceptor o una molécula coestimuladora.

[0046] Un dominio de señalización intracelular primario puede comprender un motivo de señalización que se conoce como motivo de activación basado en tirosina del inmunorreceptor o ITAM. Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmática primaria incluyen, pero sin limitarse a los mismos, los derivados de CD3 zeta, FcR gamma común (FCER1G), Fc gamma RIIa, FcR beta (Fc Epsilon R1b), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD79a, CD79b, DAP10 y DAP12.

[0047] El término "zeta" o alternativamente "cadena zeta", "CD3-zeta" o "TCR-zeta" se define como la proteína proporcionada como GenBank Acc. No. BAG36664.1, o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono, simio y similares, y un "dominio estimulador zeta" o alternativamente un "dominio estimulador CD3-zeta" o un "dominio estimulador TCR-zeta" se define como los residuos de aminoácidos del dominio citoplasmático de la cadena zeta, o derivados funcionales de los mismos, que son suficientes para transmitir funcionalmente una señal inicial necesaria para la activación de células T. En un aspecto, el dominio citoplasmático de zeta comprende los residuos 52 a 164 de GenBank Acc. No. BAG36664.1. No. BAG36664.1 o residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono, simio y similares, que sean ortólogos funcionales del mismo.

[0048] El término "molécula coestimuladora" se refiere a un compañero de unión afín en una célula T que se une específicamente con un ligando coestimulador, mediando de ese modo una respuesta coestimuladora por la célula T, tal como, pero sin limitarse a la misma, la proliferación. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de la superficie celular distintas de los receptores de antígenos o sus ligandos que contribuyen a una respuesta inmunitaria eficiente. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero no se limitan a, una molécula de MHC de clase I, BTLA y un receptor de ligando Toll, así como OX40, CD27, CD28, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) y 4-1BB (CD137). Otros ejemplos de dichas moléculas coestimuladoras incluyen ICAM-1, GITR, BAFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRP1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1. (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (táctil), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a y un ligando que se une específicamente a CD83.

[0049] Un dominio de señalización intracelular coestimulador puede ser la parte intracelular de una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora puede estar representada en las siguientes familias de proteínas: proteínas receptoras de TNF, proteínas similares a inmunoglobulinas, receptores de citocinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM) y receptores de células NK activadoras. Entre los ejemplos de dichas moléculas se incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFR, HVEM, ICAM-1, antígeno asociado a la función linfocítica 1 (LFA-1), CD2, CD7, CD287, LIGHT, NKG2C, NKG2D, SLAMF7, NKp80, NKp30, NKp44, NKp46, CD160, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83, y similares.

[0050] El dominio de señalización intracelular puede comprender la parte intracelular completa, o el dominio de señalización intracelular nativo completo, de la molécula de la que se deriva, o un fragmento funcional o derivado del mismo.

[0051] El término "4-1 BB" se refiere a un miembro de la superfamilia TNFR con una secuencia de aminoácidos proporcionada como GenBank Acc. No. AAA62478.2, o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono, simio y similares; y un "dominio coestimulador de 4-1BB" se define como los residuos

de aminoácidos 214-255 de GenBank Acc. No. AAA62478.2, o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono, simio y similares.

[0052] El término "que codifica" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, de servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (por ejemplo, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de ello. Por lo tanto, un gen, ADNc o ARN, codifica una proteína si la transcripción y traducción del ARNm correspondiente a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y se proporciona habitualmente en listas de secuencias, como la cadena no codificante, utilizada como plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, pueden denominarse como codificantes de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

[0053] El término "expresión" se refiere a la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos particular impulsada por un promotor.

[0054] El término "vector de transferencia" se refiere a una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que puede utilizarse para administrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. Se conocen numerosos vectores en la técnica, incluidos, pero sin limitarse a los mismos, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfífilos, plásmidos y virus. Por lo tanto, el término "vector de transferencia" incluye un plásmido que se replica de forma autónoma. El término también debe interpretarse de modo que incluya además compuestos no plásmidos y no virales que facilitan la transferencia de transgenes a las células. En algunos casos, un vector de transferencia es una construcción de ADN plasmídico que codifica transgenes y elementos cis lentivirales necesarios para el empaquetamiento y la inserción en el genoma del huésped.

[0055] El término "lentivirus" se refiere a un género de la familia Retroviridae. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus por su capacidad de infectar células que no se dividen; pueden introducir una cantidad significativa de información genética en el ADN de la célula huésped, por lo que son uno de los procedimientos más eficientes de un vector de suministro de genes. El VIH, el VIS y el VIF son ejemplos de lentivirus.

[0056] El término "vector lentiviral" se refiere a un vector que incluye una o más secuencias de ácido nucleico derivadas de al menos una parte de un genoma lentiviral. Un vector lentiviral puede contener secuencias no codificantes de una o más proteínas de un lentivirus (por ejemplo, VIH-1). Un "vector de transferencia lentiviral" puede incluir una secuencia de ácido nucleico heteróloga, por ejemplo, que se va a transferir a una célula, y puede incluir además, por ejemplo, uno o más genes lentivirales, o partes de los mismos. Un "vector de empaquetamiento lentiviral" puede incluir uno o más genes que codifican proteínas lentivirales, o partes de las mismas. Por ejemplo, una proteína de envoltura lentiviral puede incluir un gen que codifica una proteína env, o una parte de la misma. La transfección de células huésped con un vector de transferencia y uno o más vectores de empaquetamiento se puede llevar a cabo con el fin de producir un virus, que a su vez se va a utilizar para infectar células diana para expresar uno o más transgenes comprendidos dentro de una secuencia de ácido nucleico heteróloga dentro de las células diana. Por lo tanto, un "transgén" se refiere a un gen heterólogo que se transfiere a una célula diana, por ejemplo, utilizando un vector de transferencia lentiviral de la presente invención. En ciertos ejemplos descritos en el presente documento, un transgén es un gen que codifica un receptor de antígeno quimérico, tales como los descritos en el presente documento.

[0057] El término "aislado" significa alterado o eliminado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido presente de forma natural en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico o péptido separado parcial o completamente de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado". Un ácido nucleico o proteína aislado puede existir en forma sustancialmente purificada, o puede existir en un entorno no nativo, tal como, por ejemplo, una célula huésped.

[0058] El término "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o ácidos ribonucleicos (ARN) y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes modificadas de forma conservadora de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNP y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye por residuos de base mixta y/o de desoxiinosina (Batzner et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); y Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

[0059] Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente y se refieren a un compuesto que comprende residuos de aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. Una proteína o un péptido debe contener al menos dos aminoácidos y no se impone ninguna limitación sobre el número máximo de aminoácidos que pueden comprender la secuencia de una proteína o un péptido. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína

que comprenda dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Tal como se utiliza en el presente documento, el término se refiere tanto a cadenas cortas, a las que también se hace referencia comúnmente en la técnica como péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, como a cadenas más largas, a las que generalmente se hace referencia en la técnica como proteínas, de las que existen muchos tipos. Los "polipéptidos" incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Un polipéptido incluye un péptido natural, un péptido recombinante o una combinación de los mismos.

[0060] El término "promotor" se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, necesaria para iniciar la transcripción específica de una secuencia de polinucleótidos.

[0061] El término "secuencia promotora/reguladora" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se requiere para la expresión de un producto génico unido operativamente a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora central y en otros casos, esta secuencia también puede incluir una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que se requieren para la expresión del producto génico. La secuencia promotora/reguladora puede ser, por ejemplo, una que exprese el producto génico de una manera específica de tejido.

[0062] Tal como se utiliza en el presente documento, un "poli(A)" es una serie de adenosinas unidas por poliadenilación al ARNm. En la realización preferida de una construcción para expresión transitoria, el poli(A) tiene una longitud de entre 50 y 5000 nucleótidos, preferiblemente mayor de 64 nucleótidos, más preferiblemente mayor de 100 nucleótidos, lo más preferiblemente mayor de 300 o 400 nucleótidos. Las secuencias de poli(A) se pueden modificar química o enzimáticamente para modular la funcionalidad del ARNm, tal como la localización, la estabilidad o la eficiencia de la traducción.

[0063] Tal como se utiliza en el presente documento, "poliadenilación" se refiere al enlace covalente de un resto de poliadenililo, o su variante modificada, a una molécula de ARN mensajero. En los organismos eucariotas, la mayoría de las moléculas de ARN mensajero (ARNm) están poliadeniladas en el extremo 3'. La cola de poli(A) 3' es una secuencia larga de nucleótidos de adenina (a menudo varios cientos) añadidos al pre-ARNm mediante la acción de una enzima, la poliadenilato polimerasa. En eucariotas superiores, la cola de poli(A) se añade a las transcripciones que contienen una secuencia específica, la señal de poliadenilación. La cola de poli(A) y la proteína unida a ella ayudan a proteger el ARNm de la degradación por exonucleasas. La poliadenilación también es importante para la terminación de la transcripción, la exportación del ARNm desde el núcleo y la traducción. La poliadenilación se produce en el núcleo inmediatamente después de la transcripción de ADN en ARN, pero además también puede producirse más tarde en el citoplasma. Una vez finalizada la transcripción, la cadena de ARNm se escinde mediante la acción de un complejo de endonucleasas asociado con la ARN polimerasa. El sitio de escisión suele caracterizarse por la presencia de la secuencia de bases AAUAAA cerca del sitio de escisión. Una vez escindido el ARNm, se añaden residuos de adenosina al extremo 3' libre en el sitio de escisión.

[0064] El término "sujeto" pretende incluir un organismo vivo (por ejemplo, mamíferos, seres humanos). En algunos casos, un sujeto puede ser un sujeto en el que se puede provocar una respuesta inmunitaria.

[0065] El término "transfectado" o "transformado" o "transducido" se refiere a un proceso por el cual se transfiere o introduce ácido nucleico exógeno en la célula huésped. Una célula "transfectada" o "transformada" o "transducida" es una que ha sido transfectada, transformada o transducida con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula primaria de la presente invención y su progenie. Una célula "infectada" es una que ha sido transfectada, transformada o transducida con un patógeno, por ejemplo, un virus (por ejemplo, un lentivirus). En algunos casos, uno o más elementos de ácido nucleico viral pueden estar integrados en el genoma de una célula infectada.

[0066] La presente invención proporciona varias ventajas. Por ejemplo, los vectores de transferencia viral de la presente invención se pueden utilizar para lograr una mayor producción de ARN genómico viral en células de empaquetamiento, una mayor exportación nuclear de ARN y un mayor título viral. Además, los vectores de transferencia viral pueden ser de un tamaño relativamente pequeño, en comparación con los vectores anteriores, lo que facilita su uso y permite la inserción de secuencias heterólogas más grandes.

[0067] Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0068]

La **Figura 1** es un esquema que muestra el mapa de características del vector de transferencia lentiviral pCINS. P-CMV = promotor del citomegalovirus (CMV); R = región R de LTR, U5 = región U5 de LTR, PBS = sitio de unión al cebador; SD = sitio donante de empalme principal; psi = señal de empaquetamiento; RRE = elemento sensible a Rev; SA7 = sitio aceptor de empalme; cPPT = tracto central de polipurina; SA1 = sitio aceptor de empalme; EF1A = promotor alfa EF1 humano; EGFP = marco de lectura abierto (ORF) del reportero GFP; WPRE = elemento regulador

postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota; SV40 polyA = secuencia de poliadenilación de SV40; nptII = gen de resistencia a la kanamicina; pUC ori = origen de replicación de pUC.

La **Figura 2** es un esquema que muestra el mapa de restricción del vector de transferencia lentiviral pCINS, incluida la ubicación de cada sitio de restricción dentro de la secuencia del vector.

La **Figura 3** es un esquema que muestra el mapa de características del vector de transferencia lentiviral pNOX. P-CMV = promotor del citomegalovirus (CMV); R = región R de LTR, U5 = región U5 de LTR, PBS = sitio de unión al cebador; SD = sitio donante de empalme principal; psi = señal de empaquetamiento; RRE = elemento sensible a Rev; SA7 = sitio aceptor de empalme; cPPT = tracto central de polipurina; SA1 = sitio aceptor de empalme; EF1A = promotor EF1alfa humano; EGFP = marco de lectura abierto (ORF) del reportero GFP; HPRE-NoX = elemento regulador postranscripcional de la hepatitis B, sin ORF que codifique la proteína X; dU3 = región U3 de LTR truncada; SV40 polyA = secuencia de poliadenilación de SV40; nptII = gen de resistencia a la kanamicina; pUC ori = origen de replicación de pUC.

La **Figura 4** es un esquema que muestra el mapa de restricción del vector de transferencia lentiviral pNOX, incluida la ubicación de cada sitio de restricción dentro de la secuencia del vector.

La **Figura 5** es una serie de gráficos que muestran el rendimiento de los vectores pCINS y pNOX que codifican GFP entre sí y en comparación con otros vectores lentivirales. En estos experimentos se utilizaron los siguientes vectores de empaquetamiento: pNVS-MDG-VSVG-Kan; pNVS-MDLgp-RRE; pNVS RSV Rev-Kan. **(A)** El uso del vector de transferencia pCINS da como resultado un título viral varias veces superior al generado utilizando el vector de transferencia parental antes de la optimización. **(B)** Los vectores pCINS y pNOX generan títulos virales similares en células 293T. **(C)** pNOX generó títulos virales más altos en células Jurkat en comparación con pCINS. **(D)** La transducción de células T humanas primarias con pCINS o pNOX dio como resultado la generación de porcentajes similares de células T que expresaban GFP, lo que indica que pCINS y pNOX generan títulos infecciosos similares en células T humanas primarias. **(E)** Una población de células T que habían sido transducidas con pNOX, que contiene el elemento regulador postranscripcional HPRE, mostró cantidades similares de células GFP+ después de la integración de secuencias de vectores lentivirales en comparación con una población de células T transducidas con pCINS, que contiene el elemento regulador postranscripcional WPRE.

La **Figura 6** es un esquema que muestra ciertas características que se modificaron en una estrategia emprendida para optimizar un sistema de producción lentiviral.

La **Figura 7** es un conjunto de gráficos que muestran el rendimiento del vector de transferencia parental y los vectores de transferencia pNLV entre sí. **(A)** El uso de la estructura principal lentiviral de pNLV produce más ARN genómico lentiviral empaquetado que la estructura principal lentiviral del vector GFP de control, según lo medido por qRT-PCR utilizando el kit de titulación qRT-PCR Lenti-X (Clontech). **(B)** La transducción de células 293T con el vector pNLV generó títulos virales más altos en comparación con el vector de transferencia de control, según lo medido por el ensayo de integración proviral utilizando qPCR.

La **Figura 8** es una serie de gráficos que muestran mediciones de FACS de la expresión del transgén en células SupT1 transducidas con vectores lentivirales pCINS o pNLV que expresan un transgén (por ejemplo, un CAR). **(A)** Gráfico de FACS de células transducidas con un vector lentiviral pCINS que contiene un transgén, utilizando un anticuerpo conjugado con PE como reactivo de detección para el transgén en la superficie. **(B)** Gráfico de FACS de células transducidas con un vector lentiviral pNLV que contiene un transgén, utilizando un anticuerpo conjugado con PE como reactivo de detección para el transgén. **(C)** Gráfico que compara el parámetro MFI medido en los análisis de FACS de **(A-B)**, que muestra una mayor expresión en superficie del transgén en células transducidas con el vector de transferencia pNLV.

La **Figura 9** es una serie de gráficos que comparan los títulos virales de vectores de transferencia comerciales con un vector de control, que es el vector de transferencia SIN que codifica GFP antes de la optimización, y con los vectores de transferencia pCINS y pNLV. **(A)** El vector lentiviral pLVX (Clontech) de segunda generación se produjo con la construcción Tatexpressing y se transdujo en células 293T y se encontró que tenía un título viral ligeramente más alto que un vector de transferencia de control. **(B)** El vector lentiviral pLenti6.2 (Life Technologies) se transdujo en células y se encontró que tenía una gran disminución en el título viral en comparación con el vector de transferencia de control. **(C)** El vector lentiviral pD2109 (DNA2.0) se transdujo en células y se encontró que tenía una pequeña disminución en el título viral en comparación con el vector de transferencia de control. **(D)** El vector lentiviral pCINS se transdujo en células y se encontró que tenía un título viral mucho más alto que el vector de transferencia de control. **(E)** El vector lentiviral pNLV se transdujo en células y se encontró que tenía un título viral más alto que el vector de transferencia pCINS.

La **Figura 10** es un esquema y un gráfico que compara los efectos de diferentes mutaciones del sitio de empalme en la construcción de transferencia no optimizada de control sobre el título viral. **(A)** El panel A muestra un esquema que muestra la cadena principal lentiviral con puntas de flecha etiquetadas que indican la ubicación de los sitios donantes y aceptores de empalme que fueron mutados para la posterior determinación del título viral. **(B)** Los diversos mutantes del sitio donante y aceptor de empalme del vector de transferencia indicado se transdujeron en células y el título viral se comparó en todo el panel de mutantes con un vector de transferencia de control. Todas las mutaciones llevaron a una gran disminución en el título viral, y los vectores de transferencia SA7mut y E-SAMut tuvieron títulos ligeramente mejorados.

La **Figura 11** es un esquema y un gráfico de una estructura principal de vector de transferencia que contiene delecciones de secuencias derivadas de gag y/o env y que compara los efectos posteriores en el título viral. **(A)** El panel A muestra un esquema de la estructura principal lentiviral con anotaciones que indican la ubicación aproximada de las delecciones de gag y/o env. **(B)** Las construcciones de vector de transferencia con delecciones en las regiones env y/o gag se transdujeron en células y se determinó el título viral. En comparación con un vector de transferencia

de control, los mutantes -env3' y -gag3'-env5' tuvieron una disminución en el título viral, mientras que -env5' y -gag3' mostraron poca diferencia en el título viral.

La **Figura 12** es una serie de esquemas que representan varias alineaciones de secuencias entre el vector de transferencia pNLV y el vector de transferencia pRRLSIN a través de elementos en cis virales clave. **(A)** El panel A muestra un esquema de la alineación entre las regiones psi de los dos vectores, con las regiones sombreadas que indican áreas de variación de secuencia. **(B)** El panel B muestra un esquema de la alineación entre las regiones gag de los dos vectores, con las regiones sombreadas que indican áreas de variación de secuencia. **(C)** El panel C muestra un esquema de la alineación entre las regiones env de los dos vectores, con las regiones sombreadas que indican áreas de variación de secuencia. **(D)** El panel D muestra un esquema de la alineación entre las regiones RRE de los dos vectores, con las regiones sombreadas que indican áreas de variación de secuencia. **(E)** El panel E muestra un esquema de la alineación entre las regiones env (con el sitio aceptor de empalme principal 7) de los dos vectores, con las regiones sombreadas que indican áreas de variación de secuencia. **(F)** El panel F muestra un esquema de la alineación entre las regiones pol (con cPPT y el sitio aceptor de empalme principal 1) de los dos vectores, con las regiones sombreadas indicando áreas de variación de secuencia. # = Sustitución de un solo nucleótido. Fila superior = pNLV; fila inferior = pRRLSIN. La secuencia de pRRLSIN corresponde a la secuencia del vector pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE (plásmido Addgene n.º 12252). La secuencia de cPPT de pNLV es la de SEQ ID NO:92.

La **Figura 13** es un esquema que muestra un mapa de características del vector de transferencia lentiviral pNLV.

La **Figura 14** es un esquema que muestra el mapa de restricción del vector de transferencia lentiviral pNLV, incluida la ubicación de cada sitio de restricción dentro de la secuencia del vector.

DESCRIPCIÓN MÁS DETALLADA DE LA INVENCION

[0069] La presente invención da a conocer vectores de transferencia lentivirales y sus usos. En general, los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención incluyen una secuencia de ácido nucleico heterólogo, tal como, por ejemplo, una secuencia que codifica un transgén (por ejemplo, un gen que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR); véase más adelante). Los vectores de transferencia lentivirales incluyen además una combinación de características deseables adicionales, tal como se describe más adelante y como se define en las reivindicaciones.

[0070] Los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención pueden ser útiles, por ejemplo, para proporcionar una secuencia de ácido nucleico heterólogo a una célula huésped para empaquetamiento en un virus, que a su vez puede usarse para expresar un transgén dentro de la secuencia de ácido nucleico heterólogo en una célula diana deseada. Por ejemplo, los vectores de transferencia lentivirales pueden introducirse en una célula huésped en combinación con, por ejemplo, uno o más vectores de empaquetamiento, de modo que la célula huésped produzca un lentivirus. El lentivirus puede usarse entonces, por ejemplo, para infectar una célula diana deseada. En ciertos casos, la infección lentiviral de la célula diana deseada puede dar como resultado la integración de una o más secuencias de ácido nucleico del vector de transferencia lentiviral (por ejemplo, un ácido nucleico heterólogo que codifica un transgén) en el genoma de la célula diana deseada (por ejemplo, una célula T). Por lo tanto, la célula transducida puede ser capaz de expresar uno o más genes (por ejemplo, un gen de CAR) presentes en el ácido nucleico heterólogo y/o los elementos virales, y esta capacidad puede transmitirse a la progenie de la célula transducida.

[0071] La introducción de secuencias de ácido nucleico del vector de transferencia lentiviral de la presente invención en una célula diana, a través de un lentivirus generado en una célula huésped, puede permitir la expresión, por la célula diana, de elementos del vector de transferencia lentiviral (por ejemplo, el ácido nucleico heterólogo que codifica el transgén).

Elementos vectoriales de transferencia

[0072] Los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención comprenden los elementos en asociación operativa como se define en las reivindicaciones.

[0073] Los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención incluyen elementos adecuados para permitir la transferencia de ácidos nucleicos heterólogos presentes en el vector de transferencia lentiviral a una célula (por ejemplo, una célula transfectada con el vector de transferencia lentiviral y, de manera opcional, uno o más vectores adicionales, tales como vectores de empaquetamiento). En particular, los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención se caracterizan por las siguientes características: (a) incluyen un promotor de citomegalovirus (CMV); (b) incluyen un polinucleótido que codifica al menos una parte de una proteína gag que incluye una secuencia inhibidora de INS1 mutada que reduce la restricción de la exportación nuclear de ARN en relación con INS1 de tipo salvaje; (c) no incluyen un polinucleótido que codifica secuencias inhibitoras INS2, INS3 e INS4 de gag; y (d) no incluyen un origen de replicación SV40 y/o un origen de replicación f1. En algunos casos, un vector de transferencia lentiviral de la presente invención incluye un elemento cPPT que tiene una longitud de aproximadamente 178 nucleótidos (por ejemplo, aproximadamente 100, 110, 120, 125, 130, 140, 150, 160, 170, 175, 178, 180, 190, 200, 225 o 250 nucleótidos). En un caso, el elemento cPPT tiene una longitud de 178 nucleótidos. En ciertos casos, el vector incluye una secuencia de Kozak ubicada en dirección 5' (por ejemplo, inmediatamente en dirección 5') de un ácido nucleico heterólogo o transgén que se va a transferir a una célula huésped.

[0074] Los vectores de transferencia lentivirales pueden incluir lo siguiente: un promotor (por ejemplo, un promotor de CMV, RSV o EF1a) que impulsa la expresión de una o más secuencias virales, regiones de repetición terminal larga (LTR) (una región R y una región U5), un sitio de unión al cebador (PBS), una señal de empaquetamiento (psi) que incluye un sitio donante de empalme principal (SD), una secuencia de gag parcial, una secuencia de env parcial, un elemento sensible a Rev (RRE), una secuencia de env parcial adicional que incluye un sitio aceptor de empalme (por ejemplo, un aceptor de empalme SA7), una secuencia de pol parcial que incluye un tracto central de polipurina (cPPT) (por ejemplo, un cPPT que comprende un sitio aceptor de empalme, por ejemplo, SA1), un promotor EF1a subgenómico, un ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, un ácido nucleico heterólogo que incluye un gen que codifica EGFP y/o un transgén de interés (por ejemplo, un gen de CAR)), un elemento regulador postranscripcional (por ejemplo, un WPRE o HPRE, que de manera opcional incluye una mutación de proteína X), de manera opcional una secuencia de poliA (por ejemplo, una cola de poliA de SV40), de manera opcional un marcador seleccionable (por ejemplo, un gen de resistencia a la kanamicina (nptII), un gen de resistencia a la ampicilina o un gen de resistencia al cloranfenicol) y de manera opcional un origen de replicación (por ejemplo, un origen de replicación pUC). Los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención no comprenden: (1) un polinucleótido que codifica las secuencias inhibitoras INS2, INS3 e INS4 de gag; ni (2) un origen de replicación de SV40 y/o un origen de replicación f1. Como se señaló anteriormente, los vectores de transferencia lentivirales incluyen un promotor EF1a, que se puede utilizar para impulsar la expresión del transgén. En casos particulares, el promotor EF1a incluye una secuencia de promotor EF1a de tipo salvaje que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 95. En algunos casos, las células transfectadas con un vector de transferencia lentiviral de la presente invención y/o un vector de empaquetamiento, tal como se describe en el presente documento, producen ARN lentiviral que se empalma principalmente. Los vectores lentivirales de la presente invención también pueden incluir secuencias adicionales (por ejemplo, secuencias de la estructura principal del vector), tales como las bien conocidas en la técnica. En ciertos casos, los vectores lentivirales de la presente invención pueden incluir o incorporar secuencias de los vectores descritos en el presente documento (por ejemplo, pNOX, pCINS y/o pNLV). En casos particulares, los vectores lentivirales de la presente invención pueden incluir o incorporar secuencias de la estructura principal del vector, o partes de las mismas, de los vectores descritos en el presente documento (por ejemplo, pNOX, pCINS y/o pNLV). En un ejemplo, un vector lentiviral de la presente invención incorpora una secuencia de la estructura principal del vector, o una parte de la misma, de pNLV.

[0075] El vector de transferencia lentiviral también puede incluir elementos adecuados para impulsar la expresión de la proteína heteróloga en una célula. En ciertos casos, una secuencia de Kozak se coloca en dirección 5' del marco de lectura abierto de la proteína heteróloga. Por ejemplo, el vector de transferencia lentiviral incluye un promotor que controla la expresión del ácido nucleico heterólogo. Los vectores de transferencia lentiviral de la presente invención comprenden un promotor EF1alfa que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 71 o 95. Otros promotores adecuados para su uso en un vector de transferencia lentiviral incluyen, por ejemplo, promotores constitutivos o promotores específicos del tipo de tejido/célula. En algunos casos, el vector de transferencia lentiviral incluye un medio para marcar selectivamente un producto génico (por ejemplo, un polipéptido o ARN) codificado por al menos una parte del ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, un producto génico de interés). Por ejemplo, el vector de transferencia lentiviral puede incluir un gen marcador (por ejemplo, un gen que codifica un marcador seleccionable, tal como una proteína fluorescente (por ejemplo, GFP, YFP, RFP, dsRed, mCherry o cualquier derivado de la misma)). El gen marcador puede expresarse independientemente del producto génico de interés. Alternativamente, el gen marcador puede coexpresarse con el producto génico de interés. Por ejemplo, el gen marcador puede estar bajo el control del mismo promotor o de uno diferente que el producto génico de interés. En otro ejemplo, el gen marcador puede fusionarse con el producto génico de interés. Los elementos de los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención están en asociación operativa entre sí, para permitir que los vectores de transferencia participen en la formación de un lentivirus en una célula transfectada, junto con uno o más vectores de empaquetamiento.

Proteínas virales

[0076] Un vector de transferencia lentiviral de la presente invención incluye uno o más genes que codifican proteínas virales, o partes de las mismas. Por ejemplo, el vector de transferencia lentiviral incluye un polinucleótido que codifica al menos una parte de una proteína gag (por ejemplo, una proteína gag del VIH-1). Los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención incluyen un polinucleótido que codifica al menos una parte de una proteína gag, en donde el polinucleótido comprende una secuencia inhibitora de INS1 mutada que reduce la restricción de la exportación nuclear de ARN en relación con INS1 de tipo salvaje del aislado NL4-3 o SF3 del VIH-1, en donde dicho polinucleótido es una secuencia de gag parcial que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 58.

[0077] En diversos ejemplos, la secuencia que codifica la proteína gag comprende 250 nucleótidos o menos, por ejemplo, 200 nucleótidos o menos, 175 nucleótidos o menos, o 150 nucleótidos o menos. En un ejemplo, la secuencia que codifica la proteína gag comprende o consiste en 168 nucleótidos. La secuencia de nucleótidos que codifica gag incluye secuencias INS1 (por ejemplo, con las mutaciones indicadas a continuación), pero carece de secuencias de INS2, INS3 e INS4. El polinucleótido que codifica la proteína gag, o una parte de la misma, puede incluir mutaciones que inactivan una o más secuencias inhibitoras, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento. Se pueden incluir mutaciones en uno o más (por ejemplo, todos) de los siguientes nucleótidos de la región INS1: G989, G992, C995, G998, C999, G1004, C1007T y C1010 (utilizando la secuencia de pNLV de la **Figura 12B** como referencia

(pNLV)). En ejemplos específicos, estas mutaciones son las siguientes: G989A, G992A, C995T, G998A, C999T, G1004A, C1007T y C1010A. Además, las secuencias que codifican gag pueden incluir una inserción que resulte en un desplazamiento de marco y una terminación prematura (véase, por ejemplo, la **Figura 12B**, a continuación) de producción indeseable de proteína gag. En ciertos casos, un vector de transferencia lentiviral puede incluir una secuencia de gag parcial (por ejemplo, una secuencia de gag parcial ubicada adyacente a y/o superpuesta a una señal de empaquetamiento en el vector de transferencia lentiviral), una secuencia de env parcial y una secuencia de pol parcial (por ejemplo, un tracto central de polipurina de pol). Las secuencias de gag parciales, env parciales y/o pol parciales pueden, en ciertos casos, originarse a partir de VIH-1 (por ejemplo, aislado de VIH-1 NL4-3 o SF3). En un ejemplo, el vector de transferencia lentiviral puede incluir una secuencia de gag parcial bajo el control de un promotor de CMV.

Elementos reguladores postranscripcionales (PRE)

[0078] Un vector de transferencia lentiviral de la presente invención incluye un elemento regulador postranscripcional (PRE). Los vectores de transferencia lentiviral de la presente invención incluyen una secuencia de PRE que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 78 o 79. Los PRE son secuencias de ácido nucleico que contribuyen a la regulación de la expresión de una secuencia de ADN dentro de la cual se encuentra el PRE. Por ejemplo, un PRE puede transcribirse junto con el resto de la secuencia de ADN. La parte de la molécula de ARNm resultante transcrita a partir del PRE puede formar una estructura terciaria que mejora la expresión del producto génico. Un PRE puede incluir, en algunos casos, tres componentes (alfa, beta y gamma). La actividad del PRE puede depender de cuántos de los componentes estén presentes. Por ejemplo, un PRE tripartito completo puede ser más activo que el componente alfa solo. Los PRE adecuados para su inclusión en los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención incluyen, por ejemplo, PRE del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) y/o PRE del virus de la hepatitis B (HPRE). En ciertos casos, un HPRE puede incluir una secuencia de HPRE natural (por ejemplo, una secuencia de HPRE natural derivada del aislado bba6 del virus de la hepatitis B, genoma completo; GenBank: KP341007.1). En algunos casos, un PRE en un vector de transferencia lentiviral de la presente invención puede modificarse para inactivar una proteína X, tal como se describe en el presente documento.

Elementos omitidos

[0079] La presente invención presenta vectores de transferencia lentivirales que se han optimizado con respecto a los vectores existentes. En algunos casos, es deseable reducir el tamaño de un vector, tal como un vector de transferencia lentiviral de la presente invención. Por ejemplo, se pueden eliminar secuencias o elementos redundantes de un vector para reducir su tamaño. En ciertos casos, se pueden eliminar orígenes de replicación innecesarios (por ejemplo, una secuencia ori de SV40 y/o una secuencia ori de f1) de un vector lentiviral. Por lo tanto, en varios ejemplos, los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención pueden tener una longitud inferior a 8000 nucleótidos, por ejemplo, una longitud inferior a 7900, 7800 o 7700 nucleótidos.

[0080] En algunos casos, se pueden eliminar del vector partes de elementos o genes codificados por un vector. Por ejemplo, los genes codificantes de proteínas pueden incluir secuencias inhibitoras. Dichas secuencias inhibitoras pueden inhibir la expresión, el procesamiento y/o la función de un gen. Por ejemplo, la proteína gag del VIH-1 incluye una serie de elementos inhibidores de ARN conocidos como elementos INS (por ejemplo, INS1, INS2, INS3 e INS4). Dichos elementos INS se describen, por ejemplo, en J. Virol. 71(7): 4892-4903, 1997; J. Virol. 66(12): 7176-7182, 1992; y J. Virol. 68(6):3784-3793, 1994. En un ejemplo, INS1 está involucrado en la restricción de la exportación nuclear de ARN viral no empalmado (ver, por ejemplo, J. Virol. 66(12):7176-7182, 1992). La eliminación o mutación de una o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) de estas secuencias inhibitoras (por ejemplo, mediante mutación de los nucleótidos que forman un elemento INS particular; véase, por ejemplo, más arriba) de un gen (por ejemplo, un gen que codifica una proteína gag, o una parte de la misma) puede, por lo tanto, aumentar la expresión, el procesamiento y/o la función del gen, o su producto génico. En un ejemplo, la mutación del elemento INS1 en un gen que codifica una proteína gag, o una parte de la misma, da como resultado una mayor exportación nuclear de ARN virales no empalmados. El vector de transferencia lentiviral de la presente invención comprende un polinucleótido que codifica al menos una parte de una proteína gag, en donde el polinucleótido comprende una secuencia inhibitora de INS1 mutada que reduce la restricción de la exportación nuclear de ARN en relación con INS1 de tipo salvaje del aislado de VIH-1 NL4-3 o SF3, en donde dicho polinucleótido es una secuencia de gag parcial que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 58. El vector de transferencia lentiviral de la presente invención no comprende (1) un polinucleótido que codifica las secuencias inhibitoras INS2, INS3 e INS4 de gag; ni (2) un origen de replicación SV40 y/o un origen de replicación f1.

[0081] En algunos casos, elementos o genes enteros codificados por un vector pueden eliminarse del vector. Por ejemplo, algunos elementos reguladores postranscripcionales, tales como WPRE, incluyen un polinucleótido que codifica una proteína X, o una parte de la misma. La proteína X se ha implicado en la generación de cánceres de hígado (véase, por ejemplo, Gen Ther. 12(1):3-4, 2005). Por tanto, puede ser beneficioso desde un punto de vista de bioseguridad evitar la actividad, función y/o expresión de la proteína X a partir del PRE de un vector de transferencia lentiviral de la presente invención. Por ejemplo, el gen que codifica la proteína X puede eliminarse del vector. Alternativamente, el codón de inicio del gen que codifica la proteína X puede mutarse (por ejemplo, de ATG a AGG),

impidiendo así la traducción de la proteína X. En otra alternativa, se pueden introducir una o más mutaciones inactivadoras en la secuencia de aminoácidos de la proteína X que impidan su función. Otros enfoques para inactivar la proteína X incluyen procedimientos de mutación bien conocidos en la técnica.

5 Vectores de empaquetamiento

[0082] Los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención pueden cotransfectarse en una célula junto con uno o más vectores adicionales. En algunos casos, dicho uno o más vectores adicionales pueden incluir vectores de empaquetamiento lentivirales. En ciertos casos, dicho uno o más plásmidos adicionales pueden incluir un plásmido de envoltura (por ejemplo, un plásmido de envoltura que codifica VSV-G, tal como pMD.G). Generalmente, un vector de empaquetamiento incluye una o más secuencias de polinucleótidos que codifican proteínas lentivirales (por ejemplo, proteína gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpu, vpr y/o nef, o un derivado, combinación o parte de las mismas). Un vector de empaquetamiento que se cotransfectará en una célula con un vector de transferencia lentiviral de la presente invención puede incluir una secuencia o secuencias que codifican una o más proteínas lentivirales no codificadas por el vector de transferencia lentiviral. Por ejemplo, un vector de transferencia lentiviral puede cotransfectarse con un primer vector de empaquetamiento que codifica gag y pol y un segundo vector de empaquetamiento que codifica rev. Por lo tanto, la cotransfección de un vector de transferencia lentiviral con dicho o dichos vectores de empaquetamiento puede dar como resultado la introducción de todos los genes necesarios para la formación de partículas virales en la célula, lo que permite que la célula produzca partículas virales que pueden aislarse. Los expertos en la materia pueden seleccionar vectores de empaquetamiento adecuados para su uso en la presente invención basándose, por ejemplo, en la consideración de las características seleccionadas para un vector de transferencia lentiviral de la presente invención. Para ejemplos de vectores de empaquetamiento que pueden usarse o adaptarse para su uso en la presente invención, véanse, por ejemplo, los documentos WO 03/064665, WO 2009/153563, Patente de Estados Unidos N.º 7.419.829, WO 2004/022761, Patente de Estados Unidos N.º 5.817.491, WO 99/41397, Patente de Estados Unidos N.º 6.924.123, Patente de Estados Unidos N.º 7.056.699, WO 99/32646, WO 98/51810 y WO 98/17815. En algunos casos, un plásmido de empaquetamiento puede codificar una proteína gag y/o pol, y puede incluir de manera opcional una secuencia RRE (por ejemplo, un vector pMDLgpRRE; véase, por ejemplo, Dull et al., J. Virol. 72(11): 8463-8471, 1998). En ciertos casos, un vector de empaquetamiento puede codificar una proteína rev (por ejemplo, un vector pRSV-Rev).

Células huésped para la producción de lentivirus

[0083] Un vector de transferencia lentiviral de la presente invención puede introducirse en una célula huésped (célula de empaquetamiento). El vector de transferencia lentiviral generalmente se cotransfecta en la célula huésped junto con uno o más vectores adicionales (por ejemplo, uno o más vectores de empaquetamiento). Dicho uno o más vectores adicionales pueden codificar proteínas virales y/o proteínas reguladoras. La cotransfección del vector de transferencia lentiviral y dicho uno o más vectores adicionales permite que la célula huésped produzca un lentivirus (por ejemplo, un lentivirus que codifica una secuencia de ácido nucleico heterólogo del vector de transferencia lentiviral). Los lentivirus producidos por una célula huésped tal como se describe en el presente documento pueden usarse para infectar otra célula. El ácido nucleico heterólogo y/o uno o más elementos adicionales (por ejemplo, promotores y elementos virales) pueden integrarse en el genoma de la célula infectada, lo que permite que la célula y su progenie expresen genes que se originan a partir del vector de transferencia lentiviral.

[0084] Una célula de empaquetamiento adecuada para la transfección con el vector de transferencia lentiviral (y uno o más vectores de empaquetamiento) puede ser una célula eucariota, tal como una célula de mamífero. La célula huésped puede tener su origen en una línea celular (por ejemplo, una línea celular inmortalizada). Por ejemplo, la célula huésped puede ser una célula HEK 293 (por ejemplo, una célula 293T que incluye el antígeno T de SV40 grande). A continuación se proporciona información sobre las células que son transducidas por los lentivirus.

[0085] La célula diana es la célula que se infecta (transduce) con un vector lentiviral (lentivirus) que codifica el transgén de interés. Después de la transducción, el transgén de interés se inserta de forma estable en el genoma de la célula diana y se puede detectar mediante procedimientos de biología molecular, tales como PCR y transferencia Southern. El transgén se puede expresar en la célula diana y detectar mediante citometría de flujo o transferencia Western. En algunos casos, la célula diana es una célula humana. En ciertos casos, la célula huésped es un tipo de célula particular de interés, por ejemplo, una célula T primaria, una célula SupT1, una célula Jurkat o una célula 293T.

Procedimientos de producción de lentivirus

[0086] Los vectores de transferencia lentivirales de la presente invención pueden ser útiles para producir lentivirus en células (por ejemplo, una célula huésped tal como se describe en el presente documento). Un procedimiento para producir un lentivirus utilizando un vector de transferencia lentiviral descrito en el presente documento generalmente implicará introducir el vector de transferencia lentiviral y uno o más vectores adicionales (por ejemplo, un vector de empaquetamiento lentiviral) en la célula. Los vectores pueden introducirse en la célula utilizando procedimientos de transfección bien conocidos en la técnica. Después de la transfección, se puede permitir que la célula exprese proteínas virales codificadas por el vector de transferencia lentiviral y/o uno o más vectores adicionales (por ejemplo, incubando la célula en condiciones estándar conocidas en la técnica para inducir la expresión génica viral). En algunos

casos, los genes virales se expresan bajo el control de un promotor constitutivo o inducible. En el último caso, la expresión génica viral puede inducirse selectivamente incubando la célula en condiciones adecuadas para activar el promotor inducible. Las proteínas virales producidas por la célula pueden formar posteriormente una partícula viral, que surge de la superficie celular y puede aislarse de la solución (por ejemplo, de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica). Durante la formación del virus, un polinucleótido que incluye la secuencia del ácido nucleico heterólogo puede incorporarse a la partícula viral. Por lo tanto, este proceso produce un lentivirus que incluye el ácido nucleico heterólogo que se origina a partir del vector de transferencia lentiviral.

Ácidos nucleicos heterólogos

[0087] La presente invención presenta un vector de transferencia lentiviral que incluye un ácido nucleico heterólogo. El vector de transferencia lentiviral de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico heterólogo que (i) codifica una EGFP y comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 76, y/o (ii) comprende una secuencia de transgén.

[0088] El ácido nucleico heterólogo puede incluir un transgén de interés (por ejemplo, un gen que codifica un polipéptido o un gen para un ARN no codificante) que se va a expresar en una célula. En algunos casos, el ORF de proteína heteróloga se coloca en dirección 3' de una secuencia de Kozak. El gen de interés puede estar, en ciertos casos, asociado con (por ejemplo, fusionado con) un gen marcador, tal como se describe en el presente documento. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo del vector de transferencia lentiviral estará presente en un lentivirus producido en una célula transfectada con el vector de transferencia lentiviral y, de manera opcional, uno o más vectores adicionales (por ejemplo, vectores de empaquetamiento). En ciertos casos, el ácido nucleico heterólogo puede integrarse en el genoma de una célula infectada con el lentivirus. La integración del ácido nucleico heterólogo en el genoma de dicha célula puede permitir que la célula y su progenie expresen el gen de interés. El gen de interés puede ser cualquier gen conocido en la técnica. Los genes de ejemplo de interés incluyen, sin limitación, genes que codifican receptores de antígenos quiméricos (CAR), restos de unión (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos), proteínas de señalización, proteínas de superficie celular (por ejemplo, receptores de células T), proteínas involucradas en enfermedades (por ejemplo, cánceres, enfermedades autoinmunes, trastornos neurológicos o cualquier otra enfermedad conocida en la técnica), o cualquier derivado o combinación de los mismos.

Receptores de antígenos quiméricos

[0089] Un vector de transferencia lentiviral de la presente invención puede utilizarse para inducir la producción de un receptor de antígeno quimérico (CAR) en una célula. Un CAR puede ser una proteína transmembrana que incluye (i) un dominio de unión a antígeno extracelular, (ii) un dominio transmembrana y (iii) un dominio de señalización intracelular. Un CAR codificado por un vector de transferencia lentiviral de la presente invención puede ser cualquier CAR conocido en la técnica. En una realización, el CAR incluye un anticuerpo anti-CD19 o un fragmento del mismo, un dominio transmembrana 4-1BB (CD137) y un dominio de señalización CD3-zeta.

Dominio de unión al antígeno

[0090] La presente invención se puede utilizar para crear células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK) que están diseñadas para contener uno o más CAR que dirigen las células efectoras inmunitarias a células no deseadas (por ejemplo, células cancerosas). Esto se logra a través de un dominio de unión a antígeno en el CAR que es específico para un antígeno asociado al cáncer. Existen dos clases de antígenos asociados al cáncer (antígenos tumorales) a los que se pueden dirigir los CAR de la presente invención: (1) antígenos asociados al cáncer que se expresan en la superficie de las células cancerosas; y (2) antígenos asociados al cáncer que en sí mismos son intracelulares, sin embargo, un fragmento de dicho antígeno (péptido) se presenta en la superficie de las células cancerosas por el MHC (complejo mayor de histocompatibilidad).

[0091] En algunos casos, el dominio de unión al antígeno es capaz de unirse específicamente a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1; molécula 1 similar a lectina de tipo C, CD33; variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII); gangliósido G2 (GD2); gangliósido GD3; antígeno de maduración de células B (BCMA) miembro de la familia del receptor de TNF; antígeno Tn ((Tn Ag) o (GalNAc-Ser/Thr)); antígeno de membrana específico de próstata (PSMA); receptor huérfano 1 de tipo receptor de tirosina quinasa (ROR1); tirosina quinasa de tipo Fms 3 (FLT3); glucoproteína 72 asociada a tumores (TAG72); CD38; CD44v6; antígeno carcinoembrionario (CEA); molécula de adhesión de células epiteliales (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); Subunidad alfa-2 del receptor de interleucina-13; mesotelina; receptor alfa de interleucina 11 (IL-11Ra); antígeno de células madre prostáticas (PSCA); serina proteasa 21; receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2); antígeno de Lewis(Y); CD24; receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-beta); antígeno embrionario 4 específico de estadio (SSEA-4); CD20; receptor alfa de folato; receptor de proteína tirosina quinasa ERBB2 (Her2/neu); mucina 1, asociada a la superficie celular (MUC1); receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); molécula de adhesión celular neural (NCAM); prostasa; fosfatasa ácida prostática (PAP); factor de elongación 2 mutado (ELF2M); efrina B2; proteína alfa de activación de fibroblastos (FAP); receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (receptor de IGF-I), anhidrasa carbónica IX (CAIX); subunidad del proteasoma (prosome, macropain), tipo beta, 9 (LMP2); glicoproteína 100 (gp100); proteína de fusión de oncogén

que consiste en la región de agrupación de puntos de ruptura (BCR) y el homólogo 1 del oncogén viral de leucemia murina de Abelson (Abl) (bcr-abl); tirosinasa; receptor 2 de efrina tipo A (EphA2); fucosil GM1; molécula de adhesión de sialil Lewis (sLe); gangliósido GM3; transglutaminasa 5 (TGS5); antígeno asociado al melanoma de alto peso molecular (HMWMAA); gangliósido o-acetil-GD2 (OAcGD2); receptor beta de folato; marcador 1 de células endoteliales tumorales (TEM1/CD248); proteína relacionada con el marcador 7 de células endoteliales tumorales (TEM7R); claudina 6 (CLDN6); receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR); receptor acoplado a proteína G, clase C, grupo 5, miembro D (GPRC5D); marco de lectura abierto 61 del cromosoma X (CXORF61); CD97; CD179a; quinasa del linfoma anaplásico (ALK); ácido polisialílico; proteína específica de placenta 1 (PLAC1); parte hexasacárida de la gliceramida globoH (GloboH); antígeno de diferenciación de la glándula mamaria (NY-BR-1); uroplaquina 2 (UPK2); receptor celular 1 del virus de la hepatitis A (HAVCR1); adrenoceptor beta 3 (ADRB3); panexina 3 (PANX3); receptor 20 acoplado a proteína G (GPR20); complejo 6 de antígeno linfocítico, locus K 9 (LY6K); receptor olfativo 51E2 (OR51E2); proteína de marco de lectura alternativo de TCR gamma (TARP); proteína del tumor de Wilms (WT1); Antígeno 1 de cáncer de testículo (NY-ESO-1); Antígeno 2 de cáncer de testículo (LAGE-1a); Antígeno 1 asociado al melanoma (MAGE-A1); gen 6 de la variante de translocación de ETS, ubicado en el cromosoma 12p (ETV6-AML); Proteína espermática 17 (SPA17); Familia de antígenos X, Miembro 1A (XAGE1); receptor de superficie celular de unión a angiopoietina 2 (Tie 2); antígeno 1 de cáncer de testículo derivado de melanoma (MAD-CT-1); antígeno 2 de cáncer de testículo derivado de melanoma (MAD-CT-2); antígeno relacionado con Fos 1; proteína tumoral p53 (p53); mutante p53; proteína; superviviente; telomerasa; antígeno tumoral 1 de carcinoma de próstata, antígeno de melanoma reconocido por células T 1; mutante de sarcoma de rata (Ras); telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT); puntos de corte de translocación del sarcoma; inhibidor de apoptosis de melanoma (ML-IAP); ERG (proteasa transmembrana, serina 2 (TMPRSS2), gen de fusión de ETS); N-acetil glucosaminil-transferasa V (NA17); proteína de caja pareada Pax-3 (PAX3); receptor de andrógenos; ciclina B1; homólogo derivado del neuroblastoma del oncogén viral de mielocitomatosis aviar v-myc (MYCN); miembro C de la familia de homólogos de Ras (RhoC); proteína 2 relacionada con la tirosinasa (TRP-2); citocromo P450 1B1 (CYP1B1); antígeno 3 de carcinoma de células escamosas similar al factor de unión a CCCTC (proteína de dedo de zinc) reconocido por células T (SART3); proteína de caja emparejada Pax-5 (PAX5); proteína de unión a proacrosina sp32 (OY-TES1); proteína tirosina quinasa específica de linfocitos (LCK); proteína de anclaje de quinasa A 4 (AKAP-4); sarcoma sinovial, punto de corte X 2 (SSX2); receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE-1); renal ubicuo 1 (RU1); renal ubicuo 2 (RU2); legumain; virus del papiloma humano E6 (HPV E6); virus del papiloma humano E7 (HPV E7); carboxil esterasa intestinal; proteína de choque térmico 70-2 mutada (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; receptor tipo inmunoglobulina asociada a leucocitos 1 (LAIR1); fragmento Fc del receptor de IgA (FCAR o CD89); miembro 2 de la subfamilia A de receptores de tipo inmunoglobulina leucocitaria (LILRA2); miembro f de la familia de moléculas similares a CD300 (CD300LF); miembro A de la familia 12 del dominio de lectina de tipo C (CLEC12A); antígeno 2 de células estromales de la médula ósea (BST2); receptor de hormona 2 similar a mucina que contiene módulo de tipo EGF (EMR2); antígeno linfocítico 75 (LY75); glipicano-3 (GPC3); proteína 5 de tipo receptor Fc (FCRL5); y polipéptido 1 de tipo inmunoglobulina lambda 1 (IGLL1);

[0092] Un CAR descrito en el presente documento puede comprender un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de anticuerpo, TCR o fragmento de TCR) que se une a un antígeno de soporte al tumor (por ejemplo, un antígeno de soporte al tumor tal como se describe en el presente documento). En algunas realizaciones, el antígeno de soporte al tumor es un antígeno presente en una célula estromal o una célula supresora derivada de mieloides (MDSC). Las células estromales pueden secretar factores de crecimiento para promover la división celular en el microambiente. Las células MDSC pueden inhibir la proliferación y activación de células T. Sin querer limitarnos a la teoría, en algunas realizaciones, las células que expresan CAR destruyen las células de soporte al tumor, inhibiendo así indirectamente el crecimiento o la supervivencia del tumor.

[0093] En realizaciones, el antígeno de células estromales se elige entre uno o más de los siguientes: antígeno 2 de células estromales de médula ósea (BST2), proteína de activación de fibroblastos (FAP) y tenascina. En una realización, el anticuerpo específico de FAP es, compite por la unión con, o tiene los mismos CDR que, sibtrozumab. En realizaciones, el antígeno MDSC se elige entre uno o más de los siguientes: CD33, CD11b, C14, CD15 y CD66b. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el antígeno que soporta el tumor se elige entre uno o más de los siguientes: antígeno 2 de células estromales de médula ósea (BST2), proteína de activación de fibroblastos (FAP) o tenascina, CD33, CD11b, C14, CD15 y CD66b.

Estructuras del dominio de unión a antígeno

[0094] El dominio de unión a antígeno de un CAR puede incluir, por ejemplo, cualquier resto de unión a polipéptido conocido en la técnica. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno puede incluir un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un scFv, un Fv, un Fab, un (Fab')₂, un anticuerpo de dominio único (SDAB), un dominio VH o VL, un dominio VHH de camélido o un anticuerpo híbrido bifuncional (por ejemplo, biespecífico)). En casos preferidos, el dominio de unión a antígeno incluye un scFv. En algunos casos, el dominio de unión a antígeno puede incluir que el dominio de unión a antígeno sea un receptor de células T (TCR), o un fragmento del mismo, por ejemplo, un TCR de cadena única (scTCR). En ciertos casos, el dominio de unión a antígeno es una molécula bi- o multispecífica (por ejemplo, una molécula de anticuerpo multispecífica). En algunos casos, el dominio de unión a antígeno reconoce una o más moléculas diana particulares de interés. Una molécula diana de interés puede estar, por ejemplo, asociada con una enfermedad o el desarrollo de la misma.

[0095] En algunos casos, los scFv se pueden preparar de acuerdo con el procedimiento conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Bird y otros, (1988) Science 242:423-426 y Huston y otros (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Las moléculas de scFv se pueden producir uniendo las regiones VH y VL entre sí utilizando enlazadores polipeptídicos flexibles. Las moléculas de scFv comprenden un enlazador (por ejemplo, un enlazador de Ser-Gly) con una longitud y/o composición de aminoácidos optimizada. La longitud del enlazador puede afectar en gran medida a la forma en que las regiones variables de un scFv se pliegan e interactúan. De hecho, si se emplea un enlazador polipeptídico corto (por ejemplo, entre 5 y 10 aminoácidos), se evita el plegamiento intracadena. El plegamiento intercadena también es necesario para unir las dos regiones variables para formar un sitio de unión a epítipo funcional. Para ver ejemplos de orientación y tamaño de enlazadores, véase, por ejemplo, Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. USA 90:6444-6448, Publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794, y Publicaciones PCT N.º WO2006/020258 y WO2007/024715.

[0096] Un scFv puede comprender un enlazador de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más residuos de aminoácidos entre sus regiones VL y VH. La secuencia enlazadora puede comprender cualquier aminoácido de origen natural. En algunas realizaciones, la secuencia enlazadora comprende los aminoácidos glicina y serina. En otra realización, la secuencia enlazadora comprende conjuntos de repeticiones de glicina y serina, tales como (Gly₄Ser)_n, donde n es un número entero positivo igual o mayor que 1 (SEQ ID NO: 22). En una realización, el enlazador puede ser (Gly₄Ser)₄ (SEQ ID NO: 29) o (Gly₄Ser)₃ (SEQ ID NO: 30). La variación en la longitud del enlazador puede conservar o mejorar la actividad, dando lugar a una eficacia superior en los estudios de actividad.

[0097] En otro aspecto, el dominio de unión a antígeno es un receptor de células T ("TCR"), o un fragmento del mismo, por ejemplo, un TCR de cadena única (scTCR). Los procedimientos para preparar dichos TCR son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Willemsen RA et al, Gene Therapy 7: 1369-1377 (2000); Zhang T et al., Cancer Gene Ther 11: 487-496 (2004); Aggen et al., Gene Ther. 19(4): 365-74 (2012)). Por ejemplo, se puede diseñar un scTCR que contenga los genes V α y V β de un clon de célula T unidos por un enlazador (por ejemplo, un péptido flexible). Este enfoque es muy útil para una diana asociada al cáncer que es intracelular, sin embargo, un fragmento de dicho antígeno (péptido) es presentado en la superficie de las células cancerosas por el MHC.

[0098] En ciertas realizaciones, el dominio de unión a antígeno codificado tiene una afinidad de unión KD de 10⁻⁴ M a 10⁻⁸ M.

[0099] En una realización, la molécula CAR codificada comprende un dominio de unión a antígeno que tiene una afinidad de unión KD de 10⁻⁴ M a 10⁻⁸ M, por ejemplo, 10⁻⁵ M a 10⁻⁷ M, por ejemplo, 10⁻⁶ M o 10⁻⁷ M, para el antígeno diana. En una realización, el dominio de unión a antígeno tiene una afinidad de unión que es al menos cinco veces, diez veces, veinte veces, treinta veces, cincuenta veces, cien veces o mil veces menor que un anticuerpo de referencia, por ejemplo, un anticuerpo descrito en el presente documento. En una realización, el dominio de unión a antígeno codificado tiene una afinidad de unión al menos cinco veces menor que un anticuerpo de referencia (por ejemplo, un anticuerpo del que se deriva el dominio de unión a antígeno). En un aspecto, dichos fragmentos de anticuerpos son funcionales porque proporcionan una respuesta biológica que puede incluir, pero sin limitarse a las mismas, la activación de una respuesta inmunitaria, la inhibición del origen de la transducción de señales a partir de su antígeno diana, la inhibición de la actividad de la quinasa y similares, como comprenderá un técnico experto en la materia.

[0100] En un aspecto, el dominio de unión al antígeno del CAR es un fragmento de anticuerpo scFv que está humanizado en comparación con la secuencia murina del scFv del que se deriva.

[0101] En un aspecto, el dominio de unión a antígeno de un CAR (por ejemplo, un scFv) está codificado por una molécula de ácido nucleico cuya secuencia ha sido optimizada por codones para la expresión en una célula de mamífero. En un aspecto, la construcción CAR completa está codificada por una molécula de ácido nucleico cuya secuencia completa ha sido optimizada por codones para la expresión en una célula de mamífero. La optimización de codones se refiere al descubrimiento de que la frecuencia de aparición de codones sinónimos (es decir, codones que codifican el mismo aminoácido) en el ADN codificante está sesgada en diferentes especies. Dicha degeneración de codones permite que un polipéptido idéntico sea codificado por una variedad de secuencias de nucleótidos. Se conoce una variedad de procedimientos de optimización de codones en la técnica, e incluyen, por ejemplo, procedimientos divulgados en al menos las patentes de Estados Unidos Nos. 5.786.464 y 6.114.148.

Pares de anticuerpos y antígenos específicos

[0102] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra CD22 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Haso et al., Blood, 121(7): 1165-1174 (2013); Wayne et al., Clin Cancer Res 16(6): 1894-1903 (2010); Kato et al., Leuk Res 37(1):83-88 (2013); Creative BioMart (creativebiomart.net): MOM-18047-S(P).

[0103] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra CS-1 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de Elotuzumab (BMS), véase por ejemplo, Tai et al., 2008, Blood 112(4): 1329-37; Tai et al., 2007, Blood.

110(5):1656-63.

[0104] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra CLL-1 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de un anticuerpo disponible en R&D, ebiosciences, Abcam, por ejemplo, PE-CLL1-hu Cat# 353604 (BioLegend); y PE-CLL1 (CLEC12A) Cat# 562566 (BD).

[0105] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra CD33 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Bross et al., Clin Cancer Res 7(6):1490-1496 (2001) (Gemtuzumab Ozogamicina, hP67.6), Caron et al., Cancer Res 52(24):6761-6767 (1992) (Lintuzumab, HuM195), Lapusan et al., Invest New Drugs 30(3):1121-1131 (2012) (AVE9633), Aigner et al., Leukemia 27(5): 1107-1115 (2013) (AMG330, CD33 BiTE), Dutour et al., Adv hematol 2012:683065 (2012), y Pizzitola et al., Leukemia doi:10.1038/Lue.2014.62 (2014).

[0106] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra GD2 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Mujoo et al., Cancer Res. 47(4): 1098-1104 (1987); Cheung et al., Cancer Res 45(6): 2642-2649 (1985), Cheung et al., J Clin Oncol 5(9): 1430-1440 (1987), Cheung et al., J Clin Oncol 16(9): 3053-3060 (1998), Handgretinger et al., Cancer Immunol Immunother 35(3):199-204 (1992)). En algunas realizaciones, un dominio de unión a antígeno contra GD2 es una parte de unión a antígeno de un anticuerpo seleccionado entre mAb 14.18, 14G2a, ch14.18, hu14.18, 3F8, hu3F8, 3G6, 8B6, 60C3, 10B8, ME36.1 y 8H9, véase, por ejemplo, los documentos WO2012033885, WO2013040371, WO2013192294, WO2013061273, WO2013123061, WO2013074916 y WO201385552. En algunas realizaciones, un dominio de unión a antígeno contra GD2 es una parte de unión a antígeno de un anticuerpo descrito en la Publicación de Estados Unidos n.º: 20100150910 o Número de publicación PCT:WO 2011160119.

[0107] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra BCMA es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, los documentos WO2012163805, WO200112812 y WO2003062401.

[0108] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra el antígeno Tn es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, US 8.440.798, Brooks et al., PNAS 107(22): 10056-10061 (2010)), y Stone et al., OncoImmunology 1(6): 863-873(2012)).

[0109] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra PSMA es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Parker et al., Protein Expr Purif 89(2): 136-145 (2013), US 20110268656 (J591ScFv); Frigerio et al, European J Cancer 49(9): 2223-2232 (2013) (scFvD2B); WO 2006125481 (mAbs 3/A12, 3/E7 y 3/F11) y fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla (scFv A5 y D7).

[0110] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra ROR1 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Hudecek et al., Clin Cancer Res 19(12): 3153-3164 (2013); WO 2011159847; y US20130101607.

[0111] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra FLT3 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, los documentos WO2011076922, US5777084, EP0754230, US20090297529, y varios anticuerpos de catálogo comercial (I+D, ebiosciences, Abcam).

[0112] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra TAG72 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Hombach et al., Gastroenterology 113(4): 1163-1170 (1997); y Abeam ab691.

[0113] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra FAP es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Ostermann et al., Clinical Cancer Research 14: 4584-4592 (2008)) (FAP5), Publicación de patente de Estados Unidos N.º 2009/0304718; sibrotuzumab (véase, por ejemplo, Hofheinz et al., Oncology Research and Treatment 26(1), 2003); y Tran et al., J Exp Med 210(6): 1125-1135 (2013).

[0114] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra CD38 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de daratumumab (véase, por ejemplo, Green et al., Blood 116(21): 1261-1262 (2010); MOR202 (véase, por ejemplo, US 8.263.746); o anticuerpos descritos en el documento US 8.362.211.

[0115] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra CD44v6 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Casucci et al., Blood 122(20): 3461-3472 (2013).

[0116] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra CEA es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Chmielewski et al., Gastroenterology 143(4): 1095-1107 (2012).

[0117] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra EPCAM es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo seleccionado entre MT110, Ab biespecífico EpCAM-CD3 (véase, por ejemplo, clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00635596); Edrecolomab; 3622W94; ING-1; y adecatumumab (MT201).

[0118] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra PRSS21 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en la Patente de Estados Unidos N.º 8.080.650.

5 [0119] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra B7H3 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de un anticuerpo MGA271 (Macrogenics).

10 [0120] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra KIT es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, los documentos US7915391, US20120288506 y varios anticuerpos de catálogo comercial.

15 [0121] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra IL-13Ra2 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, los documentos WO2008/146911, WO2004087758, varios anticuerpos de catálogo comercial, y WO2004087758.

[0122] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra CD30 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, los documentos US7090843 B1 y EP0805871.

20 [0123] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra GD3 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, los documentos US7253263; US 8.207.308; US 20120276046; EP1013761; WO2005035577; y US6437098.

25 [0124] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra CD171 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Hong et al., J Immunother 37(2):93-104 (2014)).

30 [0125] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra IL-11Ra es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de un anticuerpo disponible de Abcam (cat# ab55262) o Novus Biologicals (cat# EPR5446). En otra realización, un dominio de unión a antígeno contra IL-11Ra es un péptido, véase, por ejemplo, Huang et al., Cancer Res 72(1): 271-281 (2012).

35 [0126] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra PSCA es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Morgenroth et al., Prostate 67(10): 1121-1131 (2007)) (scFv7F5); Nejatollahi et al., J of Oncology 2013(2013), ID de artículo 839831(scFv C5-II); y Publicación de patente de Estados Unidos n.º 20090311181.

[0127] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra VEGFR2 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Chinnasamy et al., J Clin Invest 120(11): 3953-3968 (2010)).

40 [0128] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra LewisY es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Kelly et al., Cancer Biother Radiopharm 23(4): 411-423 (2008)) (Ab hu3S193 (scFv));Dolezal et al., Protein Engineering 16(1):47-56 (2003) (NC10 scFv).

45 [0129] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra CD24 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Maliar et al., Gastroenterology 143(5): 1375-1384 (2012).

[0130] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra PDGFR-beta es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de un anticuerpo Abcam ab32570.

50 [0131] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra SSEA-4 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo MC813 (Cell Signaling) u otros anticuerpos disponibles comercialmente.

[0132] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra CD20 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo Rituximab, Ofatumumab, Ocrelizumab, Veltuzumab o GA101.

55 [0133] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra el receptor de folato alfa es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo IMGN853, o un anticuerpo descrito en los documentos US20120009181; US4851332, LK26:US5952484.

60 [0134] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra ERBB2 (Her2/neu) es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo trastuzumab o pertuzumab.

[0135] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra MUC1 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo SAR566658.

65 [0136] En una realización, el dominio de unión a antígeno contra EGFR es la parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo cetuximab, panitumumab, zalutumumab, nimotuzumab o matuzumab.

[0137] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra NCAM es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del clon de anticuerpo 2-2B: MAB5324 (EMD Millipore).

5 [0138] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra Ephrin B2 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Abengozar et al., Blood 119(19):4565-4576 (2012).

10 [0139] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra el receptor de IGF-I es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, los documentos US8344112 B2; EP2322550 A1; WO 2006/138315, o PCT/US2006/022995.

[0140] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra CAIX es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del clon de anticuerpo 303123 (R&D Systems).

15 [0141] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra LMP2 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, los documentos US 7.410.640 o US20050129701.

20 [0142] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra gp100 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo HMB45, NK1betaB, o un anticuerpo descrito en los documentos WO2013165940, o US20130295007.

[0143] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra la tirosinasa es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, en los documentos US5843674; o US19950504048.

25 [0144] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra EphA2 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Yu et al., Mol Ther 22(1): 102-111 (2014).

30 [0145] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra GD3 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, los documentos US7253263; US 8.207.308; US 0120276046; EP1013761 A3; 20120276046; WO2005035577; o US6437098.

[0146] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra fucosil GM1 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, los documentos US20100297138; o WO2007/067992.

35 [0147] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra sLe es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, del anticuerpo G193 (para Lewis Y), véase Scott AM et al., Cancer Res 60: 3254-61 (2000)), también como se describe en Neeson et al, J Immunol mayo de 2013 190 (Suplemento del resumen de la reunión) 177.10.

40 [0148] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra GM3 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, del anticuerpo CA 2523449 (mAb 14F7).

45 [0149] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra HMWMAA es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Kmiecik et al., Oncoimmunology 3(1): e27185 (2014) (PMID: 24575382) (mAb9.2.27); documentos US6528481; WO2010033866; o US 20140004124.

[0150] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra o-acetil-GD2 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, del anticuerpo 8B6.

50 [0151] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra TEM1/CD248 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Marty et al., Cancer Lett 235(2): 298-308 (2006)); Zhao et al., J Immunol Methods 363(2): 221-232 (2011)).

55 [0152] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra CLDN6 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, del anticuerpo IMAB027 (Ganymed Pharmaceuticals), véase, por ejemplo, clinicaltrial.gov/show/NCT02054351.

[0153] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra TSHR es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, los documentos US 8.603.466; US 8.501.415; o US 8.309.693.

60 [0154] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra GPRC5D es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, del anticuerpo FAB6300A (R&D Systems); o LS-A4180 (Lifespan Biosciences).

65 [0155] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra CD97 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, US 6.846.911; de Groot et al., J Immunol 183(6): 4127-4134 (2009); o un anticuerpo de R&D:MAB3734.

[0156] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra ALK es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Mino-Kenudson et al., Clin Cancer Res 16(5): 1561-1571 (2010).

[0157] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra ácido polisiálico es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Nagae et al., J Biol Chem 288(47): 33784-33796 (2013).

[0158] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra PLAC1 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Ghods et al., Biotechnol Appl Biochem 2013 doi:10.1002/bab.1177.

[0159] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra GloboH es una parte de unión a antígeno del anticuerpo VK9; o un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Kudryashov V et al., Glycoconj J. 15(3):243-9 (1998)), Lou et al., Proc Natl Acad Sci USA 111(7):2482-2487 (2014)); MBr1: Bremer EG et al. J Biol Chem 259:14773-14777 (1984)).

[0160] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra NY-BR-1 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Jager et al., Appl Immunohistochem Mol Morphol 15(1): 77-83 (2007).

[0161] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra WT-1 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Dao et al., Sci Transl Med 5(176): 176ra33 (2013); o WO2012/135854.

[0162] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra MAGE-A1 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Willemsen et al., J Immunol 174(12): 7853-7858 (2005) (scFv similar a TCR).

[0163] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra la proteína de esperma 17 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Song et al., Target Oncol 14 de agosto de 2013 (PMID: 23943313); Song et al., Med Oncol 29(4): 2923-2931 (2012).

[0164] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra Tie 2 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, del anticuerpo AB33 (Cell Signaling Technology).

[0165] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra MAD-CT-2 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, PMID: 2450952; US7635753.

[0166] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra el antígeno 1 relacionado con Fos es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, del anticuerpo 12F9 (Novus Biologicals).

[0167] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra MelanA/MART1 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en el documento EP 2514766 A2; o US 7.749.719.

[0168] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra puntos de ruptura de translocación de sarcoma es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Luo et al, EMBO Mol. Med. 4(6): 453-461 (2012).

[0169] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra TRP-2 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Wang et al., J Exp Med. 184(6): 2207-16 (1996).

[0170] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra CYP1B1 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDRs, de un anticuerpo descrito en, por ejemplo, Maecker et al, Blood 102 (9): 3287-3294 (2003).

[0171] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra RAGE-1 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo MAB5328 (EMD Millipore).

[0172] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra la transcriptasa inversa de la telomerasa humana es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo cat no: LS-B95-100 (Lifespan Biosciences).

[0173] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra la carboxil esterasa intestinal es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo 4F12: cat no: LS-B6190-50 (Lifespan Biosciences).

[0174] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra mut hsp70-2 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo Lifespan Biosciences: monoclonal: cat no: LS-C133261-100 (Lifespan Biosciences).

[0175] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra CD79a es una parte de unión a antígeno, por ejemplo,

CDR, del anticuerpo Anticuerpo Anti-CD79a [HM47/A9] (ab3121), disponible en Abcam; anticuerpo Anticuerpo CD79A #3351 disponible en Cell Signalling Technology; o anticuerpo HPA017748 - Anticuerpo Anti-CD79A producido en conejo, disponible en Sigma Aldrich.

- 5 [0176] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra CD79b es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo polatuzumab vedotin, anti-CD79b descrito en Dornan et al., "Therapeutic potential of fan anti-CD79b antibody-drug conjugate, anti-CD79b-vc-MMAE, for the treatment of non-Hodgkin lymphoma", Blood 24 de septiembre de 2009; 114(13):2721-9. doi: 10.1182/blood-2009-02-205500. Publicación electrónica 24 de julio de 2009, o el anticuerpo biespecífico Anti-CD79b/CD3 descrito en "4507 Pre-Clinical Characterization of T Cell-Dependent Bispecific Antibody Anti-CD79b/CD3 As a Potential Therapy for B Cell Malignancies" Resúmenes de la 56.^a reunión y exposición anual de la ASH, San Francisco, California, del 6 al 9 de diciembre de 2014.

- 15 [0177] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra CD72 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo J3-109 descrito en Myers y Uckun, "An anti-CD72 immunotoxin against therapy-refractory B-lineage acute lymphoblastic leukemia" Leuk Lymphoma. Junio de 1995;18(1-2): 119-22, o anti-CD72 (10D6.8.1, mlgG1) descrito en Polson et al., "Antibody-Drug Conjugates for the Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma: Target and Linker-Drug Selection" Cancer Res 15 de marzo de 2009 69; 2358.

- 20 [0178] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra LAIR1 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo ANT-301 LAIR1, disponible en ProSpec; o el anticuerpo anti-CD305 humano (LAIR1), disponible en BioLegend.

- 25 [0179] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra FCAR es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo CD89/FCARAntibody (Catálogo n.º 10414-H08H), disponible en Sino Biological Inc.

- [0180] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra LILRA2 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo Anticuerpo monoclonal LILRA2 (M17), clon 3C7, disponible de Abnova, o anticuerpo anti-LILRA2 de ratón, monoclonal (2D7), disponible de Lifespan Biosciences.

- 30 [0181] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra CD300LF es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo Anticuerpo Anti-molécula similar a CMRF35 1 de ratón, Monoclonal[UP-D2], disponible en BioLegend, o el anticuerpo Anti-molécula similar a CMRF35 1 de rata, Monoclonal[234903], disponible en R&D Systems.

- 35 [0182] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra CLEC12A es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo scFv Bispecific T cell Engager (BiTE) y ADC descritos en Noordhuis et al., "Targeting of CLEC12A in Acute Myeloid Leukemia by Antibody-Drug-Conjugates and Bispecific CLL-1xCD3", 53.^a reunión y exposición anual de la ASH, 10-13 de diciembre de 2011, y MCLA-117 (Merus).

- 40 [0183] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra BST2 (también llamado CD317) es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo Anticuerpo Anti-CD317 de ratón, Monoclonal[3H4], disponible en Antibodies-Online o el anticuerpo Anti-CD317 de ratón, Monoclonal[696739], disponible en R&D Systems.

- 45 [0184] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra EMR2 (también llamado CD312) es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo Anticuerpo Anti-CD312 de ratón, Monoclonal[LS-B8033] disponible en Lifespan Biosciences, o el anticuerpo Anti-CD312 de ratón, Monoclonal[494025] disponible en R&D Systems.

- 50 [0185] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra LY75 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo Anticuerpo Anti-antígeno de linfocito 75 de ratón, Monoclonal[HD30] disponible de EMD Millipore o el anticuerpo Anti-antígeno de Linfocito 75 de ratón, Monoclonal[A15797] disponible de Life Technologies.

- 55 [0186] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra GPC3 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo hGC33 descrito en Nakano K, Ishiguro T, Konishi H, et al. Generation of a humanized anti-glypican 3 antibody by CDR grafting and stability optimization. Anticancer Drugs. 2010 Nov; 21(10):907-916, o MDX-1414, HN3 o YP7, los tres descritos en Feng et al., "Glypican-3 antibodies: a new therapeutic target for liver cancers". FEBS Lett. 21 de enero de 2014;588(2):377-82.

- 60 [0187] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra FCRL5 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo anti-FcRL5 descrito en Elkins et al., "FcRL5 as a target of antibody-drug conjugates for the treatment of multiple myeloma" Mol Cancer Ther. 2012 Oct;11(10): 2222-32.

- 65 [0188] En una realización, un dominio de unión a antígeno contra IGLL1 es una parte de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, del anticuerpo Anti-polipéptido similar a inmunoglobulina lambda 1 de ratón, Monoclonal [AT1G4] disponible en Lifespan Biosciences, anticuerpo Anti-polipéptido similar a inmunoglobulina lambda 1 de ratón, Monoclonal[HSL11] disponible en BioLegend.

[0189] En una realización, el dominio de unión a antígeno comprende una, dos, tres (por ejemplo, las tres) CDR de cadena pesada, HC CDR1, HC CDR2 y HC CDR3, de un anticuerpo enumerado anteriormente, y/o una, dos, tres (por ejemplo, las tres) CDR de cadena ligera, LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3, de un anticuerpo enumerado anteriormente. En una realización, el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo enumerado anteriormente.

[0190] En otro aspecto, el dominio de unión a antígeno comprende un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo. En algunos aspectos, un anticuerpo no humano está humanizado, donde secuencias o regiones específicas del anticuerpo se modifican para aumentar la similitud con un anticuerpo producido de forma natural en un ser humano o un fragmento del mismo. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno está humanizado.

CAR biespecíficos

[0191] En ciertas realizaciones, el dominio de unión al antígeno es una molécula bi- o multi-específica (por ejemplo, una molécula de anticuerpo multiespecífica). En una realización, una molécula de anticuerpo multiespecífica es una molécula de anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico tiene especificidad para no más de dos antígenos. Una molécula de anticuerpo biespecífico se caracteriza por una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un primer epítipo y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un segundo epítipo. En una realización, el primer y el segundo epítipos están en el mismo antígeno, por ejemplo, la misma proteína (o subunidad de una proteína multimérica). En una realización, el primer y el segundo epítipos se superponen. En una realización, el primer y el segundo epítipos no se superponen. En una realización, el primer y el segundo epítipos están en diferentes antígenos, por ejemplo, diferentes proteínas (o diferentes subunidades de una proteína multimérica). En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que tienen especificidad de unión para un primer epítipo y una secuencia de dominio variable de cadena pesada y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que tienen especificidad de unión para un segundo epítipo. En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende un semianticuerpo que tiene especificidad de unión para un primer epítipo y un semianticuerpo que tiene especificidad de unión para un segundo epítipo. En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende un semianticuerpo, o un fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un primer epítipo y un semianticuerpo, o un fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un segundo epítipo. En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende un scFv, o un fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un primer epítipo y un scFv, o un fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un segundo epítipo.

[0192] En ciertas realizaciones, la molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo multiespecífica (por ejemplo, biespecífica o triespecífica). Dichas moléculas incluyen proteínas de fusión biespecíficas, por ejemplo, una construcción de expresión que contiene dos scFv con un enlazador peptídico helicoidal hidrófilo entre ellos y una región constante completa, tal como se describe, por ejemplo, en el documento US5637481; construcciones de minicuerpos con cadenas VL y VH unidas además con espaciadores peptídicos a una región de bisagra de anticuerpo y una región CH3, que se pueden dimerizar para formar moléculas biespecíficas/multivalentes, tal como se describe, por ejemplo, en el documento US5837821; cadena de dominios VH (o dominios VL en miembros de la familia) unidos por enlaces peptídicos con grupos reticulables en el extremo C asociados además con dominios VL para formar una serie de Fv (o scFv), tal como se describe, por ejemplo, en el documento US5864019; y los polipéptidos de unión de cadena sencilla con un dominio VH y un dominio VL unidos a través de un enlazador peptídico se combinan en estructuras multivalentes a través de reticulación no covalente o química para formar, por ejemplo, estructuras homobivalentes, heterobivalentes, trivalentes y tetravalentes utilizando tanto el formato de tipo scFv como el de tipo diacuerpo, tal como se describe, por ejemplo, en el documento US5869620.

[0193] Dentro de cada anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, scFv) de una molécula de anticuerpo biespecífico, el VH puede estar aguas arriba o aguas abajo del VL. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aguas arriba (por ejemplo, scFv) está dispuesto con su VH (VH₁) aguas arriba de su VL (VL₁) y el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aguas abajo (por ejemplo, scFv) está dispuesto con su VL (VL₂) aguas arriba de su VH (VH₂), de modo que la molécula de anticuerpo biespecífico global tiene la disposición VH₁-VL₁-VL₂-VH₂. En otras realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, scFv) situado aguas arriba está dispuesto con su VL (VL₁) aguas arriba de su VH (VH₁) y el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, scFv) situado aguas abajo está dispuesto con su VH (VH₂) aguas arriba de su VL (VL₂), de modo que la molécula de anticuerpo biespecífico global tiene la disposición VL₁-VH₁-VH₂-VL₂. De manera opcional, se dispone un enlazador entre los dos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, scFv), por ejemplo, entre VL₁ y VL₂ si la construcción está dispuesta como VH₁-VL₁-VL₂-VH₂, o entre VH₁ y VH₂ si la construcción está dispuesta como VL₁-VH₁-VH₂-VL₂. El enlazador puede ser un enlazador tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, un enlazador (Gly₄-Ser)_n, donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, preferiblemente 4 (SEQ ID NO: 29). En general, el enlazador entre los dos scFv debe ser lo suficientemente largo para evitar el emparejamiento incorrecto entre los dominios de los dos scFv. De manera opcional, un enlazador se dispone entre el VL y el VH del primer scFv. De manera opcional, un enlazador se dispone entre el VL y el VH del segundo scFv. En construcciones que tienen múltiples enlazadores, dos o más de los enlazadores pueden ser iguales o diferentes. En consecuencia, en algunas realizaciones, un CAR biespecífico

comprende VL, VH y, de manera opcional, uno o más enlazadores en una disposición tal como se describe en el presente documento.

Dominio transmembrana

[0194] Un dominio transmembrana del CAR puede ser cualquier dominio polipeptídico capaz de atravesar una bicapa de fosfolípidos, de modo que un extremo del dominio esté unido, por ejemplo, a un dominio de unión a antígeno extracelular, y el otro extremo esté unido, por ejemplo, a un dominio de señalización intracelular. Un dominio transmembrana puede incluir uno o más aminoácidos adicionales adyacentes a la región transmembrana, por ejemplo, uno o más aminoácidos asociados con la región extracelular de la proteína de la que se derivó la transmembrana (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 15 aminoácidos de la región extracelular) y/o uno o más aminoácidos adicionales asociados con la región intracelular de la proteína de la que se deriva la proteína transmembrana (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 15 aminoácidos de la región intracelular). El dominio transmembrana puede estar asociado con uno de los otros dominios del CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana puede seleccionarse o modificarse mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana de superficie, por ejemplo, para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor. En un aspecto, el dominio transmembrana es capaz de homodimerizarse con otro CAR en la superficie de una célula que expresa CAR. En un aspecto diferente, la secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana puede modificarse o sustituirse de modo que se minimicen las interacciones con los dominios de unión del compañero de unión nativo presente en la misma célula que expresa CAR. Un dominio transmembrana de uso particular en la presente invención puede incluir al menos la región o regiones transmembrana, por ejemplo, de la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD27, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. En algunas realizaciones, un dominio transmembrana puede incluir al menos la región o regiones transmembrana de, por ejemplo, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFRR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R α , ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (táctil), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKG2D, NKG2C.

[0195] En algunos casos, el dominio transmembrana se puede unir a la región extracelular del CAR, por ejemplo, el dominio de unión a antígeno del CAR, a través de una bisagra, por ejemplo, una bisagra de una proteína humana. Por ejemplo, en una realización, la bisagra puede ser una bisagra de Ig (inmunoglobulina) humana (por ejemplo, una bisagra de IgG4, una bisagra de IgD), un enlazador GS (por ejemplo, un enlazador GS descrito en el presente documento), una bisagra de KIR2DS2 o una bisagra de CD8a. En una realización, la bisagra o espaciador comprende (por ejemplo, consiste en) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En un aspecto, el dominio transmembrana comprende (por ejemplo, consiste en) un dominio transmembrana de SEQ ID NO: 12.

[0196] En ciertas realizaciones, el dominio transmembrana codificado comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio transmembrana CD8 que tiene al menos una, dos o tres modificaciones pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, o una secuencia con 95-99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En una realización, el dominio transmembrana codificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 12.

[0197] En otras realizaciones, la molécula de ácido nucleico que codifica el CAR comprende una secuencia de nucleótidos de un dominio transmembrana CD8, por ejemplo, que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 13, o una secuencia con 95-99 % de identidad de la misma.

[0198] En ciertas realizaciones, el dominio de unión a antígeno codificado está conectado al dominio transmembrana por una región bisagra. En una realización, la región bisagra codificada comprende la secuencia de aminoácidos de una bisagra CD8, por ejemplo, SEQ ID NO: 4; o la secuencia de aminoácidos de una bisagra IgG4, por ejemplo, SEQ ID NO: 6, o una secuencia con una identidad del 95-99 % con la SEQ ID NO: 4 o 6. En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica la región bisagra comprende una secuencia de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7, correspondiente a una bisagra CD8 o una bisagra IgG4, respectivamente, o una secuencia con una identidad del 95-99 % con la SEQ ID NO: 5 o 7.

[0199] En un aspecto, la bisagra o espaciador comprende una bisagra de IgG4. Por ejemplo, en una realización, la bisagra o espaciador comprende una bisagra de la secuencia de aminoácidos ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLGKM (SEQ ID NO:6). En algunas realizaciones, la bisagra o espaciador comprende una bisagra codificada por una secuencia de nucleótidos de

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTCCTGGGCGGACCCAGCGT
 GTTCCTGTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAGGTGACCTGTGT
 GGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG
 TGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTG
 CTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGGC
 CTGCCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTA
 CACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGG
 GCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAG
 ACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAG
 AGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTAC
 ACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG (SEQ ID NO:7).

[0200] En un aspecto, la bisagra o espaciador comprende una bisagra de IgD. Por ejemplo, en una realización, la bisagra o espaciador comprende una bisagra de la secuencia de aminoácidos

5 RWPEPKAQASSVPTAQPAEGLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSTHTQ
 PLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLT
 LPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAPVKLSNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNLL
 LMWLEDQREVNTSGFAPARPPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCWSHEDSRLLNASRSLE VSYVTDH
 10 (SEQ ID NO:8). En algunas realizaciones, la bisagra o espaciador comprende una bisagra codificada por una
 secuencia de nucleótidos de

AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCCAGGCATCTAGTGTTCTACTGCACAGCCCCAGGCAGAAGG
 CAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACTGGCCGTGGCGGGGAGGAGAA
 GAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAAGAAGAGAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCA
 TACCCAGCCGCTGGGCGTCTATCTCTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGC
 CACCTTTACATGTTTCGTGCTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCCATTTGACTTGGGAGGTTGCCGGA
 AAGGTACCCACAGGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCTCAGAGCCA
 GCACTCAAGACTCACCCCTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTCTGTACATGTACTCTAAAT
 CATCCTAGCCTGCCCCACAGCGTCTGATGGCCCTTAGAGAGCCAGCCGCCAGGCACCAGTTAAG
 CTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTGATCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTG
 TCCGGCTTTAGCCCGCCCAACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACACCAGC
 GGCTTCGCTCCAGCCCGGCCCCACCCAGCCGGGTTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGTGTCTTA
 AGGGTCCCAGCACCACTAGCCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTGTCCCATGAAGATAGC
 AGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCCTACGTGACTGACCATT (SEQ ID NO: 9).

[0201] En un aspecto, el dominio transmembrana puede ser recombinante, en cuyo caso comprenderá predominantemente residuos hidrófobos, tales como leucina y valina. En un aspecto, se puede encontrar un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana recombinante.

15 [0202] De manera opcional, un enlazador oligo- o polipeptídico corto, de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace entre el dominio transmembrana y la región citoplasmática del CAR. Un doblete de glicina-serina proporciona un enlazador particularmente adecuado. Por ejemplo, en un aspecto, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 10). En algunas realizaciones, el enlazador está codificado por una secuencia de nucleótidos de GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO: 11).

[0203] En un aspecto, la bisagra o espaciador comprende una bisagra KIR2DS2.

25 *Dominios de señalización*

[0204] Un CAR puede incluir uno o más dominios de señalización intracelular, que pueden activar y/o inhibir una o más vías de señalización intracelular en respuesta a la unión del dominio de unión al antígeno extracelular a un ligando. En algunos casos, el dominio de señalización intracelular puede ser capaz de inducir una respuesta inmunitaria. Por

ejemplo, el dominio de señalización intracelular de un CAR expresado por una célula T puede inducir la activación de la célula T tras la unión del dominio de unión al antígeno a su molécula diana afín de interés.

[0205] En realizaciones del CAR que tiene un dominio de señalización intracelular, dicho dominio puede contener, por ejemplo, uno o más de un dominio de señalización primario y/o un dominio de señalización coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia que codifica un dominio de señalización primario. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización primario y un dominio de señalización coestimulador.

[0206] Las secuencias de señalización intracelular dentro de la parte citoplasmática del CAR pueden estar unidas entre sí en un orden aleatorio o especificado. De manera opcional, un enlazador oligo- o polipeptídico corto, por ejemplo, de entre 2 y 10 aminoácidos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos) de longitud puede formar el enlace entre las secuencias de señalización intracelular. En una realización, se puede utilizar un doblete de glicina-serina como un enlazador adecuado. En una realización, se puede utilizar un solo aminoácido, por ejemplo, una alanina, una glicina, como un enlazador adecuado.

[0207] En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender dos o más, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más, dominios de señalización coestimuladores. En una realización, los dos o más, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más, dominios de señalización coestimuladores, están separados por una molécula enlazadora, por ejemplo, una molécula enlazadora descrita en el presente documento. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende dos dominios de señalización coestimuladores. En algunas realizaciones, la molécula enlazadora es un residuo de glicina. En algunas realizaciones, el enlazador es un residuo de alanina.

Dominios de señalización primarios

[0208] Un dominio de señalización primario regula la activación primaria del complejo TCR ya sea de manera estimuladora o de manera inhibidora. Los dominios de señalización intracelular primarios que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptor o ITAM.

[0209] Entre los ejemplos de ITAM que contienen dominios de señalización intracelular primarios que son de particular utilidad en la invención incluyen aquellos de CD3 zeta, FcR gamma común (FCER1G), Fc gamma RIa, FcR beta (Fc Epsilon R1b), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD79a, CD79b, DAP10 y DAP12. En una realización, un CAR comprende un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, un dominio de señalización primario de CD3-zeta.

[0210] En una realización, el dominio de señalización primario codificado comprende un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. El dominio de señalización primario de CD3 zeta codificado puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20, o una secuencia con una identidad del 95-99 % con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, el dominio de señalización primario codificado comprende una secuencia de SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20. En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de señalización primario comprende una secuencia de SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21, o una secuencia con una identidad del 95-99 % de la misma.

Dominio de señalización coestimuladora

[0211] En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular codificado comprende un dominio de señalización coestimulador. Por ejemplo, el dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización primario y un dominio de señalización coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador codificado comprende un dominio de señalización funcional de una proteína elegida entre uno o más de CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno asociado a la función linfocítica 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRP1), CD160, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (táctil), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, o NKG2D.

[0212] En ciertas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador codificado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16, o una secuencia con 95-99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. En una realización, el dominio de señalización coestimulador codificado comprende una secuencia de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de señalización coestimulador comprende una secuencia de SEQ

ID NO: 15 o SEQ ID NO: 17, o una secuencia con 95-99 % de identidad con la misma.

[0213] En otras realizaciones, el dominio intracelular codificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16, y la secuencia de SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20, en donde las secuencias que comprenden el dominio de señalización intracelular se expresan en el mismo marco y como una sola cadena polipeptídica.

[0214] En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 17, o una secuencia con una identidad del 95-99 % de la misma, y una secuencia de SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21, o una secuencia con una identidad del 95-99 % de la misma.

[0215] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica además una secuencia líder. En una realización, la secuencia líder comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2.

[0216] En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28. En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB. En un aspecto, el dominio de señalización de 4-1BB es un dominio de señalización de SEQ ID NO: 14. En un aspecto, el dominio de señalización de CD3-zeta es un dominio de señalización de SEQ ID NO: 18.

[0217] En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD27. En un aspecto, el dominio de señalización de CD27 comprende una secuencia de aminoácidos de QRRKYRSNKGESPEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP (SEQ ID NO: 16). En un aspecto, el dominio de señalización de CD27 está codificado por una secuencia de ácido nucleico de

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCC
CACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC (SEQ ID NO:
17).

Células huésped para la expresión de CAR

[0218] Tal como se señaló anteriormente, en algunos aspectos, la divulgación se refiere a una célula, por ejemplo, una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, una población de células, por ejemplo, una población de células efectoras inmunitarias) que comprende una molécula de ácido nucleico, una molécula de polipéptido CAR o un vector, tal como se describe en el presente documento. La presente invención proporciona una célula huésped que comprende el vector de transferencia lentiviral de la presente invención.

[0219] En ciertos aspectos de la presente divulgación, las células efectoras inmunitarias, por ejemplo, las células T, se pueden obtener a partir de una unidad de sangre extraída de un sujeto utilizando cualquier grupo de técnicas conocidas por el experto en la materia, tales como la separación con Ficoll™. En un aspecto preferido, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen mediante aféresis. El producto de la aféresis contiene típicamente linfocitos, incluyendo células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En un aspecto, las células recogidas mediante aféresis se pueden lavar para eliminar la fracción plasmática y, de manera opcional, para colocar las células en un tampón o medio apropiado para las etapas de procesamiento posteriores. En una realización, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En una realización alternativa, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, si no todos, los cationes divalentes.

[0220] Las etapas de activación inicial en ausencia de calcio pueden conducir a una activación magnificada. Tal como entenderán fácilmente los expertos en la materia, se puede realizar una etapa de lavado mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia, tales como mediante el uso de una centrifugación de "flujo continuo" semiautomatizada (por ejemplo, el procesador de células Cobe 2991, el Baxter CytoMate o el Haemonetics Cell Saver 5) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del lavado, las células se pueden resuspender en una variedad de tampones biocompatibles, tales como, por ejemplo, PBS sin Ca, sin Mg, PlasmaLyte A u otra solución salina con o sin tampón. Alternativamente, se pueden eliminar los componentes indeseables de la muestra de aféresis y las células se pueden resuspender directamente en medios de cultivo.

[0221] Se reconoce que los procedimientos de la solicitud pueden utilizar condiciones de medios de cultivo que comprenden 5 % o menos, por ejemplo 2 %, de suero AB humano, y emplear condiciones y composiciones de medios de cultivo conocidas, por ejemplo aquellas descritas en Smith et al., "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement", Clinical & Translational Immunology (2015) 4, e31; doi:10.1038/cti.2014.31.

[0222] En un aspecto, las células T se aíslan de los linfocitos de sangre periférica mediante la lisis de los glóbulos rojos y el agotamiento de los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente de PERCOLL™ o mediante elutriación centrífuga a contraflujo.

[0223] Los procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir, por ejemplo, la selección de una subpoblación específica de células efectoras inmunitarias, por ejemplo, células T, que son una población de agotada de células T reguladoras, células agotadas de CD25+, utilizando, por ejemplo, una técnica de selección negativa, por ejemplo, descrita en el presente documento. Preferiblemente, la población de células agotadas en células T reguladoras contiene menos del 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+.

[0224] En una realización, las células T reguladoras, por ejemplo, las células T CD25+, se eliminan de la población utilizando un anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo, o un ligando de unión a CD25, IL-2. En una realización, el anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo, o el ligando de unión a CD25 se conjuga con un sustrato, por ejemplo, una microesfera, o se recubre de otro modo sobre un sustrato, por ejemplo, una microesfera. En una realización, el anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo, se conjuga con un sustrato tal como se describe en el presente documento.

[0225] En una realización, las células T reguladoras, por ejemplo, las células T CD25+, se eliminan de la población utilizando un reactivo de agotamiento de CD25 de Miltenyi™. En una realización, la relación de células con respecto al reactivo de agotamiento de CD25 es de 1e7 células por 20 uL, o de 1e7 células por 15 uL, o de 1e7 células por 10 uL, o de 1e7 células por 5 uL, o de 1e7 células por 2,5 uL, o de 1e7 células por 1,25 uL. En una realización, por ejemplo, para las células T reguladoras, por ejemplo, agotamiento de CD25+, se utiliza más de 500 millones de células/ml. En un aspecto adicional, se utiliza una concentración de células de 600, 700, 800 o 900 millones de células/ml.

[0226] En una realización, la población de células efectoras inmunitarias que se va a agotar incluye aproximadamente 6×10^9 células T CD25+. En otros aspectos, la población de células efectoras inmunitarias que se va a agotar incluye aproximadamente de 1×10^9 a 1×10^{10} células T CD25+, y cualquier valor entero intermedio. En una realización, la población resultante de células T reguladoras agotadas tiene 2×10^9 células T reguladoras, por ejemplo, células CD25+, o menos (por ejemplo, 1×10^9 , 5×10^8 , 1×10^8 , 5×10^7 , 1×10^7 , o menos células CD25+).

[0227] En una realización, las células T reguladoras, por ejemplo, las células CD25+, se eliminan de la población utilizando el sistema CliniMAC con un conjunto de tubos de agotamiento, tales como, por ejemplo, el tubo 162-01. En una realización, el sistema CliniMAC se ejecuta en un entorno de agotamiento, tal como, por ejemplo, DEPLETION2.1.

[0228] Sin querer limitarse a una teoría en particular, la disminución del nivel de reguladores negativos de células inmunitarias (por ejemplo, la disminución del número de células inmunitarias no deseadas, por ejemplo, células T_{REG}), en un sujeto antes de la aféresis o durante la fabricación de un producto celular que expresa CAR puede reducir el riesgo de recaída del sujeto. Por ejemplo, se conocen en la técnica procedimientos para reducir las células T_{REG}. Los procedimientos para reducir las células T_{REG} incluyen, pero sin limitarse a los mismos, ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR (un anticuerpo anti-GITR descrito en el presente documento), agotamiento de CD25 y combinaciones de los mismos.

[0229] En algunas realizaciones, los procedimientos de fabricación comprenden reducir el número (por ejemplo, agotar) células T_{REG} antes de fabricar la célula que expresa CAR. Por ejemplo, los procedimientos de fabricación comprenden poner en contacto la muestra, por ejemplo, la muestra de aféresis, con un anticuerpo anti-GITR y/o un anticuerpo anti-CD25 (o un fragmento del mismo, o un ligando de unión a CD25), por ejemplo, para agotar las células T_{REG} antes de fabricar el producto de célula que expresa CAR (por ejemplo, célula T, célula NK).

[0230] Un sujeto puede ser tratado previamente con una o más terapias que reducen las células T_{REG} antes de la recolección de células para la fabricación del producto celular que expresa CAR, reduciendo así el riesgo de recaída del sujeto al tratamiento con células que expresan CAR. Los procedimientos para disminuir las células T_{REG} incluyen, pero sin limitarse a los mismos, la administración al sujeto de uno o más de los siguientes: ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, agotamiento de CD25 o una combinación de los mismos. La administración de uno o más de los siguientes: ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, agotamiento de CD25 o una combinación de los mismos, puede ocurrir antes, durante o después de una infusión del producto celular que expresa CAR.

[0231] Un sujeto puede ser tratado previamente con ciclofosfamida antes de la recolección de células para la fabricación de un producto celular que exprese CAR, reduciendo así el riesgo de recaída del sujeto al tratamiento con células que expresen CAR. Un sujeto puede ser tratado previamente con un anticuerpo anti-GITR antes de la recolección de células para la fabricación de un producto celular que exprese CAR, reduciendo así el riesgo de recaída del sujeto al tratamiento con células que expresen CAR.

[0232] En una realización, la población de células que se eliminará no son ni las células T reguladoras ni las células tumorales, sino células que de otro modo afectan negativamente la expansión y/o función de las células CART, por ejemplo, células que expresan CD14, CD11b, CD33, CD15 u otros marcadores expresados por células potencialmente inmunosupresoras. En una realización, se prevé que dichas células se eliminen simultáneamente con las células T

reguladoras y/o las células tumorales, o después de dicho agotamiento, o en otro orden.

[0233] Los procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir más de una etapa de selección, por ejemplo, más de una etapa de agotamiento. El enriquecimiento de una población de células T mediante selección negativa se puede lograr, por ejemplo, con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie exclusivos de las células seleccionadas negativamente. Un procedimiento es la clasificación y/o selección de células mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4⁺ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales puede incluir anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8.

[0234] Los procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir además la eliminación de células de la población que expresan un antígeno tumoral, por ejemplo, un antígeno tumoral que no comprende CD25, por ejemplo, CD19, CD30, CD38, CD123, CD20, CD14 o CD11b, para proporcionar de ese modo una población de células agotadas en células T reguladoras, por ejemplo, agotadas en CD25⁺ y agotadas en antígenos tumorales que son adecuadas para la expresión de un CAR, por ejemplo, un CAR descrito en el presente documento. En una realización, las células que expresan antígeno tumoral se eliminan simultáneamente con las células T reguladoras, por ejemplo, CD25⁺. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25, o fragmento del mismo, y un anticuerpo anti-antígeno tumoral, o fragmento del mismo, se pueden unir al mismo sustrato, por ejemplo, microesfera, que se puede utilizar para eliminar las células o un anticuerpo anti-CD25, o fragmento del mismo, o el anticuerpo anti-antígeno tumoral, o fragmento del mismo, se pueden unir a microesferas separadas, una mezcla de las cuales se puede utilizar para eliminar las células. En otras realizaciones, la eliminación de células T reguladoras, por ejemplo, células CD25⁺, y la eliminación de las células que expresan antígeno tumoral es secuencial y puede ocurrir, por ejemplo, en cualquier orden.

[0235] También se dan a conocer procedimientos que incluyen la eliminación de células de la población que expresan un inhibidor de puntos de control, por ejemplo, un inhibidor de puntos de control descrito en el presente documento, por ejemplo, una o más de células PD1⁺, células LAG3⁺ y células TIM3⁺, para proporcionar de ese modo una población de células agotadas en células T reguladoras, por ejemplo, células agotadas en CD25⁺, y células agotadas en inhibidores de puntos de control, por ejemplo, células agotadas en PD1⁺, LAG3⁺ y/o TIM3⁺. Los inhibidores de puntos de control de ejemplo incluyen B7-H1, B7-1, CD160, P1H, 2B4, PD1, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, TIGIT, CTLA-4, BTLA y LAIR1. En una realización, las células que expresan inhibidores de puntos de control se eliminan simultáneamente con las células T reguladoras, por ejemplo, células CD25⁺. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo, y un anticuerpo anti-inhibidor de puntos de control, o un fragmento del mismo, se pueden unir a la misma microesfera que se puede utilizar para eliminar las células, o un anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo, y el anticuerpo anti-inhibidor de puntos de control, o un fragmento del mismo, se pueden unir a microesferas separadas, una mezcla de las cuales se puede utilizar para eliminar las células. En otras realizaciones, la eliminación de células T reguladoras, por ejemplo, células CD25⁺, y la eliminación de las células que expresan inhibidores de puntos de control es secuencial, y puede ocurrir, por ejemplo, en cualquier orden.

[0236] Los procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir una etapa de selección positiva. Por ejemplo, las células T se pueden aislar mediante incubación con microesferas conjugadas con anti-CD3/anti-CD28 (por ejemplo, 3x28), tales como DYNABEADS®^M -450 CD3/CD28 T, durante un período de tiempo suficiente para la selección positiva de las células T deseadas. En una realización, el período de tiempo es de aproximadamente 30 minutos. En otra realización, el período de tiempo varía de 30 minutos a 36 horas o más y todos los valores enteros intermedios. En otra realización, el período de tiempo es de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. En aún otra realización, el período de tiempo es de 10 a 24 horas, por ejemplo, 24 horas. Se pueden utilizar tiempos de incubación más prolongados para aislar células T en cualquier situación en la que haya pocas células T en comparación con otros tipos de células, tal como en el aislamiento de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) de tejido tumoral o de individuos inmunocomprometidos. Además, el uso de tiempos de incubación más prolongados puede aumentar la eficiencia de captura de células T CD8⁺. Por lo tanto, simplemente acortando o alargando el tiempo en el que se permite que las células T se unan a las microesferas CD3/CD28 y/o aumentando o disminuyendo la relación de microesferas con respecto a células T (tal como se describe más adelante en el presente documento), se pueden seleccionar subpoblaciones de células T preferentemente a favor o en contra en el inicio del cultivo o en otros puntos temporales durante el proceso. Además, al aumentar o disminuir la relación de anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 en las microesferas u otra superficie, se pueden seleccionar subpoblaciones de células T preferentemente a favor o en contra en el inicio del cultivo o en otros puntos temporales deseados.

[0237] En una realización, se puede seleccionar una población de células T que exprese uno o más de IFN- γ , TNF α , IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, granzima B y perforina, u otras moléculas apropiadas, por ejemplo, otras citocinas. Los procedimientos para el cribado de la expresión celular se pueden determinar, por ejemplo, mediante los procedimientos descritos en la publicación PCT n.º: WO 2013/126712.

[0238] Para aislar una población deseada de células mediante selección positiva o negativa, se puede variar la concentración de células y superficie (por ejemplo, partículas, tales como microesferas). En ciertos aspectos, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan las microesferas y las células (por ejemplo,

aumentar la concentración de células), para asegurar el máximo contacto de células y microesferas. Por ejemplo, en un aspecto, se utiliza una concentración de 10 mil millones de células/ml, 9 mil millones/ml, 8 mil millones/ml, 7 mil millones/ml, 6 mil millones/ml o 5 mil millones/ml. En un aspecto, se utiliza una concentración de mil millones de células/ml. En otro aspecto, se utiliza una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En otros aspectos, se pueden utilizar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml.

[0239] El uso de altas concentraciones puede dar como resultado un aumento en el rendimiento celular, la activación celular y la expansión celular. Además, el uso de altas concentraciones celulares permite una captura más eficiente de células que pueden expresar débilmente antígenos de interés diana, tales como células T CD28-negativas, o de muestras donde hay muchas células tumorales presentes (por ejemplo, sangre leucémica, tejido tumoral, etc.). Dichas poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable obtenerlas. Por ejemplo, el uso de altas concentraciones de células permite una selección más eficiente de células T CD8+ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

[0240] En un aspecto relacionado, puede ser deseable utilizar concentraciones más bajas de células. Al diluir significativamente la mezcla de células T y superficie (por ejemplo, partículas, tales como microesferas), se minimizan las interacciones entre las partículas y las células. Esto selecciona células que expresan altas cantidades de antígenos deseados para que se unan a las partículas. Por ejemplo, las células T CD4+ expresan niveles más altos de CD28 y se capturan de manera más eficiente que las células T CD8+ en concentraciones diluidas. En un aspecto, la concentración de células utilizada es de 5×10^6 /ml. En otros aspectos, la concentración utilizada puede ser de aproximadamente 1×10^5 /ml a 1×10^6 /ml, y cualquier valor entero intermedio.

[0241] En otros aspectos, las células pueden incubarse en un rotador durante períodos de tiempo variables a velocidades variables, ya sea a 2-10 °C o a temperatura ambiente.

[0242] Las células T para estimulación también se pueden congelar después de una etapa de lavado. Sin querer limitarnos a ninguna teoría, la etapa de congelación y posterior descongelación proporciona un producto más uniforme al eliminar los granulocitos y, en cierta medida, los monocitos de la población celular. Después de la etapa de lavado que elimina el plasma y las plaquetas, las células se pueden suspender en una solución de congelación. Aunque se conocen en la técnica muchas soluciones y parámetros de congelación que serán útiles en este contexto, un procedimiento implica el uso de PBS que contiene 20 % de DMSO y 8 % de albúmina sérica humana, o medios de cultivo que contienen 10 % de dextrano 40 y 5 % de dextrosa, 20 % de albúmina sérica humana y 7,5 % de DMSO, o 31,25 % de Plasmalyte-A, 31,25 % de dextrosa al 5 %, de NaCl al 0,45 %, 10 % de dextrano 40 y 5 % de dextrosa, 20 % de albúmina sérica humana y 7,5 % de DMSO u otros medios de congelación celular adecuados que contienen, por ejemplo, Hespan y PlasmaLyte A; las células se congelan a continuación a -80 °C a una velocidad de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Se pueden utilizar otros procedimientos de congelación controlada, así como la congelación no controlada inmediatamente a -20°C o en nitrógeno líquido.

[0243] En ciertos aspectos, las células crioconservadas se descongelan y se lavan tal como se describe en el presente documento y se dejan reposar durante una hora a temperatura ambiente antes de la activación utilizando los procedimientos de la presente invención.

[0244] También se contempla la recogida de muestras de sangre o producto de aféresis de un sujeto en un período de tiempo anterior a cuando podrían ser necesarias las células expandidas tal como se describe en el presente documento. Por tanto, la fuente de las células que se expandirán se puede recoger en cualquier momento necesario, y las células deseadas, tales como células T, se pueden aislar y congelar para su uso posterior en la terapia con células efectoras inmunitarias para cualquier conjunto de enfermedades o afecciones que se beneficiarían de la terapia con células efectoras inmunitarias, tales como las descritas en el presente documento. En un aspecto, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente sano. En ciertos aspectos, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente sano que está en riesgo de desarrollar una enfermedad, pero que aún no ha desarrollado una enfermedad, y las células de interés se aíslan y congelan para su uso posterior. En ciertos aspectos, las células T se pueden expandir, congelar y usar en un momento posterior. En ciertos aspectos, se recolectan muestras de un paciente poco después del diagnóstico de una enfermedad particular tal como se describe en el presente documento, pero antes de cualquier tratamiento. En un aspecto adicional, las células se aíslan de una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto antes de cualquier conjunto de modalidades de tratamiento relevantes, que incluyen, pero sin limitarse a los mismos, el tratamiento con agentes, tales como natalizumab, efalizumab, agentes antivirales, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes immunoablativos, tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3, citoxano, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228 e irradiación.

[0245] Las células T pueden obtenerse de un paciente directamente después del tratamiento que deja al sujeto con células T funcionales. En este sentido, se ha observado que después de ciertos tratamientos contra el cáncer, en particular tratamientos con fármacos que dañan el sistema inmunológico, poco después del tratamiento durante el período en el que los pacientes normalmente se estarían recuperando del tratamiento, la calidad de las células T obtenidas puede ser óptima o mejorada en cuanto a su capacidad para expandirse ex vivo. Asimismo, después de la

manipulación ex vivo utilizando los procedimientos descritos en el presente documento, estas células pueden estar en un estado preferido para un injerto mejorado y una expansión in vivo. Por lo tanto, se contempla recolectar células sanguíneas, incluidas las células T, las células dendríticas u otras células del linaje hematopoyético, durante esta fase de recuperación. Además, en ciertos aspectos, se pueden utilizar regímenes de movilización (por ejemplo, movilización con GM-CSF) y acondicionamiento para crear una condición en un sujeto en la que se favorezca la repoblación, la recirculación, la regeneración y/o la expansión de tipos de células particulares, especialmente durante una ventana de tiempo definida después de la terapia. Los tipos de células ilustrativos incluyen células T, células B, células dendríticas y otras células del sistema inmunitario.

[0246] Las células efectoras inmunitarias que expresan una molécula CAR, por ejemplo, una molécula CAR descrita en el presente documento, pueden obtenerse de un sujeto que ha recibido una dosis baja de un inhibidor de mTOR que mejora la inmunidad. Una población de células efectoras inmunitarias, por ejemplo, células T, que se va a modificar para que expresen un CAR, puede recolectarse después de un tiempo suficiente, o después de una dosificación suficiente de la dosis baja de un inhibidor de mTOR que mejora la inmunidad, de modo que el nivel de células efectoras inmunitarias negativas para PD1, por ejemplo, células T, o la relación de células efectoras inmunitarias negativas para PD1, por ejemplo, células T/células efectoras inmunitarias positivas para PD1, por ejemplo, células T, en el sujeto o recolectadas del sujeto se haya incrementado, al menos transitoriamente.

[0247] En otras realizaciones, la población de células efectoras inmunitarias, por ejemplo, células T, que tienen CAR o serán modificadas para expresar un CAR, se pueden tratar ex vivo mediante el contacto con una cantidad de un inhibidor de mTOR que aumenta el número de células efectoras inmunitarias negativas para PD1, por ejemplo, células T o aumenta la relación de células efectoras inmunitarias negativas para PD1, por ejemplo, células T/células efectoras inmunitarias positivas para PD1, por ejemplo, células T.

[0248] En una realización, una población de células T es deficiente en diacilglicerol quinasa (DGK). Las células deficientes en DGK incluyen células que no expresan ARN o proteína DGK, o que tienen una actividad DGK reducida o inhibida. Las células deficientes en DGK se pueden generar mediante enfoques genéticos, por ejemplo, administrando agentes que interfieren con el ARN, por ejemplo, ARNsi, ARNsh, ARNm, para reducir o prevenir la expresión de DGK. Como alternativa, las células deficientes en DGK se pueden generar mediante el tratamiento con inhibidores de DGK descritos en el presente documento.

[0249] En una realización, una población de células T es deficiente en Ikaros. Las células deficientes en Ikaros incluyen células que no expresan ARN o proteína de Ikaros, o que tienen una actividad de Ikaros reducida o inhibida. Las células deficientes en Ikaros se pueden generar mediante enfoques genéticos, por ejemplo, administrando agentes que interfieren con el ARN, por ejemplo, ARNsi, ARNsh, ARNm, para reducir o prevenir la expresión de Ikaros. Como alternativa, las células deficientes en Ikaros se pueden generar mediante el tratamiento con inhibidores de Ikaros, por ejemplo, lenalidomida.

[0250] En algunas realizaciones, una población de células T es deficiente en DGK y deficiente en Ikaros, por ejemplo, no expresa DGK ni Ikaros, o tiene una actividad reducida o inhibida de DGK e Ikaros. Dichas células deficientes en DGK e Ikaros se pueden generar mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

[0251] En un caso, las células NK se obtienen del sujeto. En otra realización, las células NK son una línea de células NK, por ejemplo, la línea de células NK-92 (Conkwest).

Agentes expresados adicionales

[0252] Una célula efectora inmunitaria que expresa CAR descrita en el presente documento puede expresar además otro agente, por ejemplo, un agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR. Por ejemplo, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora. Los ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG-3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR beta, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento. El agente que inhibe una molécula inhibidora puede comprender un primer polipéptido, por ejemplo, una molécula inhibidora, asociada con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento. El agente puede comprender un primer polipéptido, por ejemplo, de una molécula inhibidora, tal como PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG-3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 o TGFR beta, o un fragmento de cualquiera de estos, y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (por ejemplo, que comprende un dominio coestimulador (por ejemplo, 41BB, CD27 o CD28, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento) y/o un dominio de señalización primario (por ejemplo, un dominio de señalización CD3 zeta descrito en el presente documento). El agente puede comprender un primer polipéptido de PD-1 o un fragmento del mismo, y un segundo polipéptido de un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (por ejemplo, un dominio de señalización CD28, CD27, OX40 o 4-1BB descrito en el presente documento y/o un dominio de señalización CD3 zeta descrito en el presente documento).

[0253] La célula efectora inmunitaria que expresa CAR descrita en el presente documento puede comprender además

un segundo CAR, por ejemplo, un segundo CAR que incluye un dominio de unión a antígeno diferente, por ejemplo, para la misma diana (por ejemplo, una diana descrita anteriormente) o una diana diferente. El segundo CAR puede incluir un dominio de unión a antígeno para una diana expresada en el mismo tipo de célula cancerosa que la diana del primer CAR. La célula efectora inmunitaria que expresa CAR puede comprender un primer CAR que se dirige a un primer antígeno e incluye un dominio de señalización intracelular que tiene un dominio de señalización coestimulador, pero no un dominio de señalización primario, y un segundo CAR que se dirige a un segundo antígeno diferente e incluye un dominio de señalización intracelular que tiene un dominio de señalización primario, pero no un dominio de señalización coestimulador.

[0254] Sin querer limitarse a la teoría, la colocación de un dominio de señalización coestimulador, por ejemplo, 4-1BB, CD28, CD27 u OX-40, sobre el primer CAR, y el dominio de señalización primario, por ejemplo, CD3 zeta, sobre el segundo CAR puede limitar la actividad del CAR a células en las que se expresan ambas dianas. La célula efectora inmunitaria que expresa el CAR puede comprender un primer CAR que incluye un dominio de unión a antígeno que se dirige, por ejemplo, a una diana descrita anteriormente, un dominio transmembrana y un dominio coestimulador y un segundo CAR que se dirige a un antígeno distinto del antígeno al que se dirige el primer CAR (por ejemplo, un antígeno expresado en el mismo tipo de célula cancerosa que la primera diana) e incluye un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización primario. La célula efectora inmunitaria que expresa CAR puede comprender un primer CAR que incluye un dominio de unión a antígeno que se dirige, por ejemplo, a una diana descrita anteriormente, un dominio transmembrana y un dominio de señalización primario y un segundo CAR que se dirige a un antígeno distinto del antígeno al que se dirige el primer CAR (por ejemplo, un antígeno expresado en el mismo tipo de célula cancerosa que la primera diana) e incluye un dominio de unión a antígeno para el antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización coestimulador.

[0255] La célula efectora inmunitaria que expresa CAR puede comprender un CAR descrito en el presente documento, por ejemplo, un CAR dirigido a una diana descrita anteriormente, y un CAR inhibidor. El CAR inhibidor puede comprender un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno que se encuentra en células normales, pero no en células cancerosas, por ejemplo, células normales que también expresan la diana. El CAR inhibidor puede comprender el dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio intracelular de una molécula inhibidora. Por ejemplo, el dominio intracelular del CAR inhibidor puede ser un dominio intracelular de PD1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG-3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 o TGFR beta.

[0256] Una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, célula T, célula NK) puede comprender un primer CAR que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno tumoral, tal como se describe en el presente documento, y un segundo CAR que comprende un dominio extracelular PD1 o un fragmento del mismo.

[0257] La célula puede comprender además una molécula inhibidora tal como se describió anteriormente.

[0258] El segundo CAR en la célula puede ser un CAR inhibidor, en donde el CAR inhibidor comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio intracelular de una molécula inhibidora. La molécula inhibidora puede elegirse entre una o más de: PD1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, TGFR beta, CEACAM-1, CEACAM-3 y CEACAM-5. La segunda molécula de CAR puede comprender el dominio extracelular de PD1 o un fragmento del mismo.

[0259] La segunda molécula de CAR en la célula puede comprender además un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización primario y/o un dominio de señalización intracelular.

[0260] El dominio de señalización intracelular en la célula puede comprender un dominio de señalización primario que comprende el dominio funcional de CD3 zeta y un dominio de señalización coestimulador que comprende el dominio funcional de 4-1 BB.

[0261] La segunda molécula de CAR en la célula puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.

[0262] El dominio de unión a antígeno de la primera molécula de CAR puede comprender un scFv y el dominio de unión a antígeno de la segunda molécula de CAR no comprende un scFv. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno de la primera molécula de CAR comprende un scFv y el dominio de unión a antígeno de la segunda molécula de CAR comprende un dominio VHH de camélido.

CAR dividido

[0263] La célula que expresa CAR puede utilizar un CAR dividido. El enfoque del CAR dividido se describe con más detalle en las publicaciones WO2014/055442 y WO2014/055657. De manera resumida, un sistema de CAR dividido comprende una célula que expresa un primer CAR que tiene un primer dominio de unión a antígeno y un dominio coestimulador (por ejemplo, 41BB), y la célula también expresa un segundo CAR que tiene un segundo dominio de unión a antígeno y un dominio de señalización intracelular (por ejemplo, CD3 zeta). Cuando la célula encuentra el primer antígeno, se activa el dominio coestimulador y la célula prolifera. Cuando la célula encuentra el segundo

antígeno, se activa el dominio de señalización intracelular y comienza la actividad de destrucción celular. Por lo tanto, la célula que expresa CAR solo se activa por completo en presencia de ambos antígenos.

Expresión de CAR múltiple

[0264] La célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede comprender además un segundo CAR, por ejemplo, un segundo CAR que incluye un dominio de unión a antígeno diferente, por ejemplo, para la misma diana o una diana diferente (por ejemplo, una diana distinta de un antígeno asociado al cáncer descrito en el presente documento o un antígeno asociado al cáncer diferente descrito en el presente documento). El segundo CAR puede incluir un dominio de unión a antígeno para una diana expresada en el mismo tipo de célula cancerosa que el antígeno asociado al cáncer. La célula que expresa CAR puede comprender un primer CAR que se dirige a un primer antígeno e incluye un dominio de señalización intracelular que tiene un dominio de señalización coestimulador pero no un dominio de señalización primario, y un segundo CAR que se dirige a un segundo antígeno diferente e incluye un dominio de señalización intracelular que tiene un dominio de señalización primario, pero no un dominio de señalización coestimulador. Si bien no se desea limitarse a la teoría, la colocación de un dominio de señalización coestimulador, por ejemplo, 4-1BB, CD28, CD27 u OX-40, en el primer CAR, y el dominio de señalización primario, por ejemplo, CD3 zeta, en el segundo CAR puede limitar la actividad del CAR a células en las que se expresan ambas dianas. La célula que expresa el CAR puede comprender un primer CAR de antígeno asociado al cáncer que incluye un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno diana descrito en el presente documento, un dominio transmembrana y un dominio coestimulador y un segundo CAR que se dirige a un antígeno diana diferente (por ejemplo, un antígeno expresado en ese mismo tipo de célula cancerosa que el primer antígeno diana) e incluye un dominio de unión al antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización primario. La célula que expresa CAR puede comprender un primer CAR que incluye un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno diana descrito en el presente documento, un dominio transmembrana y un dominio de señalización primario y un segundo CAR que se dirige a un antígeno distinto del primer antígeno diana (por ejemplo, un antígeno expresado en el mismo tipo de célula cancerosa que el primer antígeno diana) e incluye un dominio de unión a antígeno al antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización coestimulador.

[0265] La célula que expresa CAR puede comprender un primer y un segundo CAR, en donde el dominio de unión al antígeno de uno de dicho primer CAR y dicho segundo CAR, no comprende un dominio ligero variable y un dominio pesado variable. En algunos casos, el dominio de unión al antígeno de uno de dicho primer CAR y dicho segundo CAR, es un scFv, y el otro no es un scFv. El dominio de unión al antígeno de uno de dichos primeros CAR y dicho segundo CAR, puede comprender un dominio VH único, por ejemplo, un dominio VH único de camélido, tiburón o lamprea, o un dominio VH único derivado de una secuencia humana o de ratón. El dominio de unión al antígeno de uno de dicho primer CAR y dicho segundo CAR, puede comprender un nanocuerpo. El dominio de unión al antígeno de uno de dicho primer CAR y dicho segundo CAR, puede comprender un dominio VHH de camélido.

Expresión de la telomerasa

[0266] Sin querer limitarnos a ninguna teoría en particular, una célula T terapéutica puede tener una persistencia a corto plazo en un paciente, debido a telómeros acortados en la célula T; en consecuencia, la transfección con un gen de telomerasa puede alargar los telómeros de la célula T y mejorar la persistencia de la célula T en el paciente. Véase Carl June, "Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic", Journal of Clinical Investigation, 117:1466-1476 (2007)). Por lo tanto, en una realización, una célula efectora inmunitaria, por ejemplo, una célula T, expresa ectópicamente una subunidad de telomerasa, por ejemplo, la subunidad catalítica de la telomerasa, por ejemplo, TERT, por ejemplo, hTERT. Un procedimiento para producir una célula que expresa CAR puede comprender poner en contacto una célula con un ácido nucleico que codifica una subunidad de telomerasa, por ejemplo, la subunidad catalítica de la telomerasa, por ejemplo, TERT, por ejemplo, hTERT. La célula puede ponerse en contacto con el ácido nucleico antes, simultáneamente o después de ponerse en contacto con una construcción que codifica un CAR.

Expansión y Activación

[0267] Las células efectoras inmunitarias, tales como las células T, pueden activarse y expandirse generalmente utilizando procedimientos tales como los descritos, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos 6.352.694; 6.534.055; 6.905.680; 6.692.964; 5.858.358; 6.887.466; 6.905.681; 7.144.575; 7.067.318; 7.172.869; 7.232.566; 7.175.843; 5.883.223; 6.905.874; 6.797.514; 6.867.041; y Publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 20060121005.

[0268] En general, una población de células efectoras inmunitarias, por ejemplo, células agotadas en células T reguladoras, se puede expandir por contacto con una superficie que tiene unido a la misma un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de las células T. En particular, las poblaciones de células T se pueden estimular tal como se describe en el presente documento, por ejemplo por contacto con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o por contacto con un activador de la proteína quinasa C (por ejemplo, briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la coestimulación de una molécula accesoria en la superficie de las células T, se utiliza un ligando que se une a la molécula accesoria. Por ejemplo, una población de células T se

puede poner en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en condiciones apropiadas para estimular la proliferación de las células T. Para estimular la proliferación de células T CD4⁺ o células T CD8⁺, se puede utilizar un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Entre los ejemplos de un anticuerpo anti-CD28 se incluyen 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diacclone, Besançon, Francia), así como otros procedimientos conocidos comúnmente en la técnica (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Con. 190(9):13191328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

[0269] En ciertos aspectos, la señal estimuladora primaria y la señal coestimuladora para la célula T pueden proporcionarse mediante diferentes protocolos. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada señal pueden estar en solución o acoplados a una superficie. Cuando se acoplan a una superficie, los agentes pueden estar acoplados a la misma superficie (es decir, en formación "cis") o a superficies separadas (es decir, en formación "trans"). Alternativamente, un agente puede estar acoplado a una superficie y el otro agente en solución. En un aspecto, el agente que proporciona la señal coestimuladora está unido a una superficie celular y el agente que proporciona la señal de activación primaria está en solución o acoplado a una superficie. En ciertos aspectos, ambos agentes pueden estar en solución. En un aspecto, los agentes pueden estar en forma soluble, y a continuación reticularse a una superficie, tal como una célula que expresa receptores Fc o un anticuerpo u otro agente de unión que se unirá a los agentes. A este respecto, véase, por ejemplo, la Publicación de las solicitudes de patente de Estados Unidos N.º 20040101519 y 20060034810 para células presentadoras de antígenos artificiales (aAPC) que se contemplan para su uso en la activación y expansión de células T en la presente invención.

[0270] En un aspecto, los dos agentes se inmovilizan en microesferas, ya sea en la misma microesfera, es decir, "cis", o en microesferas separadas, es decir, "trans". A modo de ejemplo, el agente que proporciona la señal de activación primaria es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo y el agente que proporciona la señal coestimuladora es un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de unión al antígeno del mismo; y ambos agentes se coinmovilizan en la misma microesfera en cantidades moleculares equivalentes. En un aspecto, se utiliza una relación 1:1 de cada anticuerpo unido a las microesferas para la expansión de células T CD4⁺ y el crecimiento de células T. En ciertos aspectos de la presente invención, se utiliza una relación de anticuerpos anti-CD3:CD28 unidos a las microesferas de manera que se observa un aumento en la expansión de células T en comparación con la expansión observada utilizando una relación de 1:1. En un aspecto particular, se observa un aumento de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 veces en comparación con la expansión observada utilizando una relación de 1:1. En un aspecto, la relación de anticuerpo CD3:CD28 unido a las microesferas varía de 100:1 a 1:100 y todos los valores enteros intermedios. En un aspecto, hay más anticuerpo anti-CD28 unido a las partículas que anticuerpo anti-CD3, es decir, la relación de CD3:CD28 es menor que uno. En ciertos aspectos, la relación de anticuerpo anti-CD28 con respecto a anticuerpo anti-CD3 unido a las microesferas es mayor que 2:1. En un aspecto particular, se utiliza una relación de anticuerpo CD3:CD28 unido a microesferas de 1:100. En un aspecto, se utiliza una relación de anticuerpo CD3:CD28 unido a microesferas de 1:75. En un aspecto adicional, se utiliza una relación de anticuerpo CD3:CD28 unido a microesferas de 1:50. En un aspecto, se utiliza una relación de anticuerpo CD3:CD28 unido a microesferas de 1:30. En un aspecto preferido, se utiliza una relación de anticuerpo CD3:CD28 unido a microesferas de 1:10. En un aspecto, se utiliza una relación CD3:CD28 de anticuerpo unido a las microesferas de 1:3. En otro aspecto, se utiliza una relación de anticuerpo CD3:CD28 unido a las microesferas de 3:1.

[0271] Se pueden utilizar relaciones de partículas con respecto a células de 1:500 a 500:1 y cualquier valor entero intermedio para estimular células T u otras células diana. Como pueden entender fácilmente los expertos en la materia, la relación de partículas con respecto a células puede depender del tamaño de partícula en relación con la célula diana. Por ejemplo, las microesferas de tamaño pequeño solo podrían unirse a unas pocas células, mientras que las microesferas más grandes podrían unirse a muchas. En ciertos aspectos, la relación de células con respecto a partículas varía de 1:100 a 100:1 y cualquier valor entero intermedio y, en otros aspectos, la relación comprende de 1:9 a 9:1 y cualquier valor entero intermedio, que también se puede utilizar para estimular células T. La relación de partículas acopladas a anti-CD3 y anti-CD28 con respecto a células T que dan como resultado la estimulación de células T puede variar tal como se indicó anteriormente, sin embargo, ciertos valores preferidos incluyen 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 y 15:1, siendo una relación preferida al menos 1:1 partículas por célula T. En un aspecto, se utiliza una relación de partículas con respecto a células de 1:1 o menos. En un aspecto particular, una relación preferida de partículas:células es 1:5. En otros aspectos, la relación de partículas con respecto a células puede variar dependiendo del día de estimulación. Por ejemplo, en un aspecto, la relación de partículas con respecto a células es de 1:1 a 10:1 el primer día y se añaden partículas adicionales a las células todos los días o cada dos días a partir de entonces durante hasta 10 días, en relaciones finales de 1:1 a 1:10 (basándose en los recuentos de células el día de la adición). En un aspecto particular, la relación de partículas con respecto a células es de 1:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:5 el tercer y quinto día de estimulación. En un aspecto, las partículas se añaden diariamente o cada dos días hasta una relación final de 1:1 el primer día y de 1:5 el tercer y quinto día de estimulación. En un aspecto, la relación de partículas con respecto a células es de 2:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:10 el tercer y quinto día de estimulación. En un aspecto, las partículas se añaden diariamente o cada dos días hasta una relación final de 1:1 el primer día y de 1:10 el tercer y quinto día de estimulación. Un experto en la materia entenderá que puede ser adecuada una variedad de otras relaciones para su uso en la presente invención. En particular, las relaciones variarán dependiendo del tamaño de partícula y del tamaño y tipo de célula. En un aspecto, las relaciones más típicas para su uso están en el orden de 1:1, 2:1 y 3:1 el primer día.

[0272] En otros aspectos, las células, tales como las células T, se combinan con microesferas recubiertas con agente, las microesferas y las células se separan posteriormente y, a continuación, las células se cultivan. En un aspecto alternativo, antes del cultivo, las microesferas recubiertas con agente y las células no se separan, sino que se cultivan juntas. En otro aspecto, las microesferas y las células se concentran primero mediante la aplicación de una fuerza, tal como una fuerza magnética, lo que da como resultado una mayor ligadura de los marcadores de la superficie celular, induciendo así la estimulación celular.

[0273] A modo de ejemplo, las proteínas de la superficie celular pueden ligarse permitiendo que las microesferas paramagnéticas a las que están adheridos anti-CD3 y anti-CD28 (microesferas 3x28) entren en contacto con las células T. En un aspecto, las células (por ejemplo, de 10^4 a 10^9 células T) y las microesferas (por ejemplo, microesferas paramagnéticas DYNABEADS[®] M-450 CD3/CD28 T en una relación de 1:1) se combinan en un tampón, por ejemplo PBS (sin cationes divalentes tales como calcio y magnesio). Nuevamente, aquellos con conocimientos ordinarios en la técnica pueden entender fácilmente que puede usarse cualquier concentración de células. Por ejemplo, la célula diana puede ser muy rara en la muestra y comprender solo el 0,01 % de la muestra o la muestra entera (es decir, el 100 %) puede comprender la célula diana de interés. Por consiguiente, cualquier número de células está dentro del contexto de la presente invención. En ciertos aspectos, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan las partículas y las células (es decir, aumentar la concentración de células), para asegurar el máximo contacto de células y partículas. Por ejemplo, en un aspecto, se utiliza una concentración de aproximadamente 10 mil millones de células/ml, 9 mil millones/ml, 8 mil millones/ml, 7 mil millones/ml, 6 mil millones/ml, 5 mil millones/ml o 2 mil millones de células/ml. En un aspecto, se utiliza más de 100 millones de células/ml. En otro aspecto, se utiliza una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. En otro aspecto, se utiliza una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En otros aspectos, se pueden utilizar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede dar como resultado un aumento en el rendimiento celular, la activación celular y la expansión celular. Además, el uso de altas concentraciones celulares permite una captura más eficiente de células que pueden expresar débilmente antígenos diana de interés, tales como las células T CD28-negativas. Dichas poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable obtenerlas en ciertos aspectos. Por ejemplo, el uso de altas concentraciones de células permite una selección más eficiente de células T CD8+ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

[0274] En una realización, las células transducidas con un ácido nucleico que codifica un CAR, por ejemplo, un CAR descrito en el presente documento, se expanden, por ejemplo, mediante un procedimiento descrito en el presente documento. En una realización, las células se expanden en cultivo durante un período de varias horas (por ejemplo, aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, 21 horas) a aproximadamente 14 días (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días). En una realización, las células se expanden durante un período de 4 a 9 días. En una realización, las células se expanden durante un período de 8 días o menos, por ejemplo, 7, 6 o 5 días. En una realización, las células se expanden en cultivo durante 5 días, y las células resultantes son más potentes que las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo. La potencia se puede definir, por ejemplo, por diversas funciones de las células T, por ejemplo, proliferación, muerte de células diana, producción de citocinas, activación, migración o combinaciones de las mismas. En una realización, las células se expanden durante 5 días y muestran al menos un aumento de una, dos, tres o cuatro veces en las duplicaciones de células tras la estimulación con antígeno en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo. En una realización, las células se expanden en cultivo durante 5 días, y las células resultantes exhiben una mayor producción de citocinas proinflamatorias, por ejemplo, niveles de IFN- γ y/o GM-CSF, en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo. En una realización, las células expandidas durante 5 días muestran al menos un aumento de una, dos, tres, cuatro, cinco, diez veces o más en pg/ml de producción de citocinas proinflamatorias, por ejemplo, niveles de IFN- γ y/o GM-CSF, en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo.

[0275] También pueden desearse varios ciclos de estimulación de modo que el tiempo de cultivo de las células T pueda ser de 60 días o más. Las condiciones apropiadas para el cultivo de células T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, medio esencial mínimo o medio RPMI 1640 o X-vivo 15 (Lonza)) que puede contener factores necesarios para la proliferación y viabilidad, incluyendo suero (por ejemplo, suero fetal bovino o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β y TNF- α o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocido por el experto en la materia. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, pero sin limitarse a los mismos, surfactante, plasmanato y agentes reductores, tales como N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, ya sea sin suero o suplementados con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina o citocinas suficiente para el crecimiento y la expansión de las células T. Los antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomycin, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se van a infundir en un sujeto. Las células diana se mantienen en las condiciones necesarias para soportar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura (por ejemplo, 37 °C) y una atmósfera apropiadas (por ejemplo, aire más 5 % de CO₂).

[0276] En una realización, las células se expanden en un medio apropiado (por ejemplo, el medio descrito en el

presente documento) que incluye una o más interleucinas que dan como resultado un aumento de al menos 200 veces (por ejemplo, 200 veces, 250 veces, 300 veces, 350 veces) en las células durante un período de expansión de 14 días, por ejemplo, medido mediante un procedimiento descrito en el presente documento, tal como la citometría de flujo. En una realización, las células se expanden en presencia de IL-15 y/o IL-7 (por ejemplo, IL-15 e IL-7).

[0277] En realizaciones, los procedimientos descritos en el presente documento, por ejemplo, los procedimientos de fabricación de células que expresan CAR, comprenden la eliminación de células T reguladoras, por ejemplo, células T CD25+, de una población celular, por ejemplo, utilizando un anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo, o un ligando de unión a CD25, IL-2. En el presente documento se describen procedimientos para eliminar células T reguladoras, por ejemplo, células T CD25+, de una población celular. En realizaciones, los procedimientos, por ejemplo, los procedimientos de fabricación, comprenden además poner en contacto una población celular (por ejemplo, una población celular en la que se han agotado las células T reguladoras, tales como células T CD25+; o una población celular que ha entrado en contacto previamente con un anticuerpo anti-CD25, un fragmento del mismo o un ligando de unión a CD25) con IL-15 y/o IL-7. Por ejemplo, la población de células (por ejemplo, que ha entrado en contacto previamente con un anticuerpo anti-CD25, un fragmento del mismo o un ligando de unión a CD25) se expande en presencia de IL-15 y/o IL-7.

[0278] En algunos procedimientos, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se pone en contacto con una composición que comprende un polipéptido de interleucina-15 (IL-15), un polipéptido del receptor alfa de interleucina-15 (IL-15Ra) o una combinación de un polipéptido de IL-15 y un polipéptido de IL-15Ra, por ejemplo, hetIL-15, durante la fabricación de la célula que expresa CAR, por ejemplo, ex vivo. Una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se puede poner en contacto con una composición que comprende un polipéptido de IL-15 durante la fabricación de la célula que expresa CAR, por ejemplo, ex vivo. Una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se puede poner en contacto con una composición que comprende una combinación de un polipéptido de IL-15 y un polipéptido de IL-15 Ra durante la fabricación de la célula que expresa CAR, por ejemplo, ex vivo. Una célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede ponerse en contacto con una composición que comprende hetIL-15 durante la fabricación de la célula que expresa CAR, por ejemplo, ex vivo.

[0279] Una célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede ponerse en contacto con una composición que comprende hetIL-15 durante la expansión ex vivo. Una célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede ponerse en contacto con una composición que comprende un polipéptido IL-15 durante la expansión ex vivo. Una célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede ponerse en contacto con una composición que comprende tanto un polipéptido IL-15 como un polipéptido IL-15Ra durante la expansión ex vivo. El contacto puede dar como resultado la supervivencia y proliferación de una subpoblación de linfocitos, por ejemplo, células T CD8+.

[0280] Las células T que han sido expuestas a tiempos de estimulación variados pueden exhibir características diferentes. Por ejemplo, los productos de células mononucleares de sangre periférica de aféresis o sangre típica tienen una población de células T auxiliares (TH, CD4+) que es mayor que la población de células T citotóxicas o supresoras (TC, CD8+). La expansión ex vivo de células T mediante la estimulación de los receptores CD3 y CD28 produce una población de células T que antes de aproximadamente los días 8-9 consiste predominantemente en células TH, mientras que después de aproximadamente los días 8-9, la población de células T comprende una población cada vez mayor de células TC. En consecuencia, dependiendo del propósito del tratamiento, la infusión de un sujeto con una población de células T que comprende predominantemente células TH puede ser ventajosa. De manera similar, si se ha aislado un subconjunto específico de antígeno de células TC, puede ser beneficioso expandir este subconjunto a un mayor grado.

[0281] Adicionalmente, además de los marcadores CD4 y CD8, otros marcadores fenotípicos varían significativamente, pero en gran parte, de manera reproducible durante el transcurso del proceso de expansión celular. Por lo tanto, dicha reproducibilidad permite la capacidad de adaptar un producto de células T activadas para fines específicos.

[0282] Una vez que se construye un CAR descrito en el presente documento, se pueden utilizar varios ensayos para evaluar la actividad de la molécula, tales como, pero sin limitarse a los mismos, la capacidad de expandir las células T después de la estimulación con antígeno, mantener la expansión de las células T en ausencia de reestimulación y actividades anticancerígenas en modelos in vitro y animales apropiados. Los ensayos para evaluar los efectos de un CAR de la presente invención se describen con más detalle a continuación. El análisis de transferencia Western de la expresión de CAR en células T primarias se puede utilizar para detectar la presencia de monómeros y dímeros. Véase, por ejemplo, Milone et al., Molecular therapy 17(8): 1453-1464 (2009)). En resumen, las células T (mezcla 1:1 de células T CD4+ y CD8+) que expresan los CAR se expanden *in vitro* durante más de 10 días, seguido de lisis y electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS en condiciones reductoras. Los CAR que contienen el dominio citoplasmático TCR- ζ de longitud completa y la cadena TCR- ζ endógena se detectan mediante transferencia Western utilizando un anticuerpo contra la cadena TCR- ζ . Los mismos subconjuntos de células T se utilizan para el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS en condiciones no reductoras para permitir la evaluación de la formación de dímeros covalentes.

[0283] La expansión *in vitro* de células T CAR⁺ tras la estimulación con antígenos se puede medir mediante citometría de flujo. Por ejemplo, una mezcla de células T CD4⁺ y CD8⁺ se estimulan con aAPC αCD3/αCD28 seguida de transducción con vectores lentivirales que expresan GFP bajo el control de los promotores que se van a analizar. Los promotores de ejemplo incluyen el gen de CMV IE, EF-1α, ubiquitina C o promotores de fosfogliceroquinasa (PGK). La fluorescencia de GFP se evalúa el día 6 del cultivo en los subconjuntos de células T CD4⁺ y/o CD8⁺ mediante citometría de flujo. Véase, por ejemplo, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)). Como alternativa, una mezcla de células T CD4⁺ y CD8⁺ se estimulan con microesferas magnéticas recubiertas de αCD3/αCD28 el día 0 y se transducen con CAR el día 1 utilizando un vector lentiviral bicistrónico que expresa CAR junto con eGFP utilizando una secuencia de omisión ribosómica 2A. Los cultivos se vuelven a estimular con células K562⁺ con un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento (K562 que expresa un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento), células K562 de tipo salvaje (K562 de tipo salvaje) o células K562 que expresan hCD32 y 4-1BBL en presencia de anticuerpo antiCD3 y anti-CD28 (K562-BBL-3/28) después del lavado. Se añade IL-2 exógena a los cultivos cada dos días a 100 IU/ml. Las células T GFP⁺ se enumeran mediante citometría de flujo utilizando recuento basado en microesferas. Véase, por ejemplo, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)).

[0284] También se puede medir la expansión sostenida de células T CAR⁺ en ausencia de reestimulación. Véase, por ejemplo, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)). De manera resumida, el volumen medio de células T (fl) se mide el día 8 de cultivo utilizando un contador de partículas Coulter Multisizer III, un Nexcelom Cellometer Vision o Millipore Scepter, después de la estimulación con microesferas magnéticas recubiertas de αCD3/αCD28 el día 0 y la transducción con el CAR indicado el día 1.

[0285] También se pueden utilizar modelos animales para medir una actividad de CART. Por ejemplo, se puede utilizar un modelo de xenoinjerto que utiliza células T CAR⁺ específicas de un antígeno asociado al cáncer humano descrito en el presente documento para tratar una leucemia linfoblástica aguda (LLA) pre-B humana primaria en ratones inmunodeficientes. Véase, por ejemplo, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)). De manera muy resumida, después del establecimiento de LLA, los ratones se asignan aleatoriamente a grupos de tratamiento. Se coinyectan diferentes cantidades de células T modificadas con CAR específicas de un antígeno asociado al cáncer en una relación de 1:1 en ratones NOD-SCID-γ^{-/-} que tienen LLA-B. Se evalúa la cantidad de copias de un vector CAR específico de un antígeno asociado al cáncer en el ADN del bazo de los ratones en varios tiempos después de la inyección de células T. Se evalúa a los animales para detectar leucemia a intervalos semanales. Se miden los recuentos de células blásticas de B-ALL⁺ con antígeno asociado a cáncer descrito en el presente documento en sangre periférica en ratones a los que se les inyecta un antígeno asociado al cáncer descrito en el presente documento: células T ζ CAR⁺ o células T transducidas de forma simulada. Las curvas de supervivencia de los grupos se comparan utilizando la prueba de rango logarítmico. Además, también se pueden analizar los recuentos absolutos de células T CD4⁺ y CD8⁺ en sangre periférica 4 semanas después de la inyección de células T en ratones NOD-SCID-γ^{-/-}. A los ratones se les inyectan células leucémicas y 3 semanas después se les inyectan células T modificadas genéticamente para expresar CAR mediante un vector lentiviral bicistrónico que codifica el CAR vinculado a eGFP. Las células T se normalizan a un 45-50 % de células T GFP⁺ de entrada mezclándolas con células transducidas de forma simulada antes de la inyección y se confirman mediante citometría de flujo. Los animales se evalúan para detectar leucemia a intervalos de 1 semana. Las curvas de supervivencia de los grupos de células T CAR⁺ se comparan mediante la prueba de log-rank.

[0286] Se puede evaluar la respuesta al tratamiento con CAR dependiente de la dosis. Véase, por ejemplo, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)). Por ejemplo, se obtiene sangre periférica entre 35 y 70 días después de establecerse la leucemia en ratones a los que se les inyectó el día 21 células T CAR, una cantidad equivalente de células T transducidas de forma simulada o ninguna célula T. Se extrae sangre al azar de los ratones de cada grupo para determinar recuentos de células blásticas de ALL⁺ del antígeno asociado al cáncer en sangre periférica tal como se describe en el presente documento y, a continuación, se sacrifican los días 35 y 49. Los animales restantes se evalúan los días 57 y 70.

[0287] La evaluación de la proliferación celular y la producción de citocinas se ha descrito previamente, por ejemplo, en Milone et al., Molecular therapy 17(8): 1453-1464 (2009)). De manera resumida, la evaluación de la proliferación mediada por CAR se realiza en placas de microtitulación mezclando células T lavadas con células K562 que expresan un antígeno asociado al cáncer descrito en el presente documento (K19) o CD32 y CD137 (KT32-BBL) para una relación final de células T:K562 de 2:1. Las células K562 se irradian con radiación gamma antes de su uso. Los anticuerpos monoclonales anti-CD3 (clon OKT3) y anti-CD28 (clon 9.3) se agregan a cultivos con células KT32-BBL para que sirvan como un control positivo para estimular la proliferación de células T, ya que estas señales respaldan la expansión de células T CD8⁺ a largo plazo *ex vivo*. Las células T se enumeran en cultivos utilizando microesferas fluorescentes CountBright™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) y citometría de flujo como se describe por el fabricante. Las células T CAR⁺ se identifican por la expresión de GFP utilizando células T diseñadas con vectores lentivirales que expresan CAR unido a eGFP-2A. En el caso de las células T CAR⁺ que no expresan GFP, se detectan con una proteína recombinante biotinilada asociada al cáncer y un conjugado secundario de avidina-PE. La expresión de CD4⁺ y CD8⁺ en las células T también se detecta simultáneamente con anticuerpos monoclonales específicos (BD Biosciences). Las mediciones de citocinas se realizan en sobrenadantes recolectados 24 horas después de la reestimulación utilizando el kit de matriz de microesferas citométricas de citocinas TH1/TH2 humanas (BD Biosciences,

San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se evalúa utilizando un citómetro de flujo FACScalibur y los datos se analizan de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0288] La citotoxicidad se puede evaluar mediante un ensayo estándar de liberación de 51Cr. Véase, por ejemplo, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). De manera resumida, las células diana (líneas K562 y células primarias pro-B-ALL) se cargan con 51Cr (como NaCrO₄, New England Nuclear, Boston, MA) a 37 °C durante 2 horas con agitación frecuente, se lavan dos veces en RPMI completo y se colocan en placas de microtitulación. Las células T efectoras se mezclan con las células diana en los pocillos en RPMI completo en proporciones variables de célula efectora:célula diana (E:T). También se preparan pocillos adicionales que contienen solo medio (liberación espontánea, SR) o una solución al 1 % de detergente triton-X 100 (liberación total, TR). Después de 4 horas de incubación a 37 °C, se recolecta el sobrenadante de cada pocillo. A continuación, el 51Cr liberado se mide utilizando un contador de partículas gamma (Packard Instrument Co., Waltham, MA). Cada condición se realiza al menos por triplicado y el porcentaje de lisis se calcula mediante la fórmula: % de lisis = (ER - SR) / (TR - SR), donde ER representa el promedio de 51Cr liberado para cada condición experimental.

[0289] Las tecnologías de obtención de imágenes se pueden utilizar para evaluar el tráfico específico y la proliferación de CAR en modelos animales portadores de tumores. Dichos ensayos se han descrito, por ejemplo, en Barrett et al., *Human Gene Therapy* 22:1575-1586 (2011)). De manera resumida, se inyectan células Nalm-6 por vía intravenosa a ratones NOD/SCID/γc^{-/-} (NSG) y, 7 días después, se inyectan células T 4 horas después de la electroporación con las construcciones de CAR. Las células T se transfectan de forma estable con una construcción lentiviral para expresar luciferasa de luciérnaga y se toman imágenes de los ratones para determinar la bioluminiscencia. Como alternativa, la eficacia terapéutica y la especificidad de una única inyección de células T CAR⁺ en un modelo de xenoinjerto Nalm-6 se pueden medir de la siguiente manera: se inyectan células T Nalm-6 transducidas a ratones NSG para expresar de forma estable la luciferasa de luciérnaga, seguidas de una única inyección en la vena de la cola de células T electroporadas con CAR de la presente invención 7 días después. Se toman imágenes de los animales en varios puntos temporales posteriores a la inyección. Por ejemplo, se pueden generar mapas de calor de densidad de fotones de leucemia positiva a luciferasa de luciérnaga en ratones representativos el día 5 (2 días antes del tratamiento) y el día 8 (24 horas después de CAR + PBL).

[0290] También se pueden utilizar otros ensayos, incluidos aquellos descritos en la sección de Ejemplos en el presente documento, así como aquellos que son conocidos en la técnica, para evaluar los CAR descritos en el presente documento.

Tratamientos/Terapias combinadas

[0291] Se pueden administrar una molécula de CAR, por ejemplo, una molécula de CAR descrita en el presente documento, o una célula que comprende un ácido nucleico que codifica una molécula de CAR, por ejemplo, una molécula de CAR descrita en el presente documento. El sujeto puede tener un trastorno descrito en el presente documento, por ejemplo, el sujeto tiene cáncer, por ejemplo, el sujeto tiene un cáncer que expresa un antígeno diana descrito en el presente documento. El sujeto puede ser un ser humano.

[0292] Un sujeto que tiene una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno asociado al cáncer como se describe en el presente documento puede ser tratado comprendiendo la administración al sujeto de una cantidad efectiva de una célula que comprende una molécula CAR, por ejemplo, una molécula CAR descrita en el presente documento.

[0293] Un sujeto que tiene una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno tumoral (por ejemplo, un antígeno descrito en el presente documento), puede ser tratado comprendiendo la administración al sujeto de una cantidad eficaz de una célula, por ejemplo, una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, una población de células efectoras inmunitarias) que comprende una molécula CAR, en donde la molécula CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio intracelular, dicho dominio intracelular comprende un dominio coestimulador y/o un dominio de señalización primaria, en donde dicho dominio de unión a antígeno se une al antígeno tumoral asociado con la enfermedad, por ejemplo, un antígeno tumoral tal como se describe en el presente documento.

[0294] Un sujeto que tiene una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno tumoral puede ser tratado mediante un procedimiento que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una célula, por ejemplo, una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, una población de células efectoras inmunitarias) que comprende una molécula CAR, en combinación con un agente que aumenta la eficacia de la célula inmunitaria, en donde:

el agente que aumenta la eficacia de la célula inmunitaria se elige entre uno o más de:

- (i) un inhibidor de la proteína fosfatasa;
- (ii) un inhibidor de la quinasa;
- (iii) una citocina;
- (iv) un inhibidor de una molécula inmunoinhibidora; o
- (v) un agente que disminuye el nivel o la actividad de una célula T_{REG}.

[0295] La divulgación también presenta una composición que comprende una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, una población de células efectoras inmunitarias) que comprende una molécula CAR (por ejemplo, una molécula CAR tal como se describe en el presente documento) para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno tumoral, por ejemplo, un trastorno como se describe en el presente documento.

[0296] En ciertos casos de cualquiera de los procedimientos o usos mencionados anteriormente, la enfermedad asociada con un antígeno tumoral, por ejemplo, un antígeno tumoral descrito en el presente documento, se selecciona de una enfermedad proliferativa, tal como un cáncer o una neoplasia maligna o una afección precancerosa, tal como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia, o es una indicación no relacionada con el cáncer asociada con la expresión de un antígeno tumoral descrito en el presente documento. En un caso, la enfermedad es un cáncer descrito en el presente documento, por ejemplo, un cáncer descrito en el presente documento como asociado con una diana descrita en el presente documento. En una realización, la enfermedad es un cáncer hematológico. En un caso, el cáncer hematológico es leucemia. En un caso, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en una o más leucemias agudas que incluyen, pero sin limitarse a las mismas, leucemia linfocítica aguda de células B ("BALL"), leucemia linfocítica aguda de células T ("TALL"), leucemia linfocítica aguda (ALL); una o más leucemias crónicas, incluidas, pero sin limitarse a las mismas, leucemia mielógena crónica (CML) y leucemia linfocítica crónica (CLL); cánceres hematológicos adicionales o afecciones hematológicas que incluyen, pero sin limitarse a las mismas, leucemia prolinfocítica de células B, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, leucemia de células pilosas, linfoma folicular de células pequeñas o de células grandes, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma plasmablastico, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides, macroglobulinemia de Waldenström y "preleucemia", que son una colección diversa de afecciones hematológicas unidas por la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides, y la enfermedad asociada con la expresión de un antígeno tumoral descrito en el presente documento incluye, pero sin limitarse a las mismas, cánceres atípicos y/o no clásicos, neoplasias malignas, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas que expresan un antígeno tumoral tal como se describe en el presente documento; y cualquier combinación de las mismas. En otro caso, la enfermedad asociada con un antígeno tumoral descrito en el presente documento es un tumor sólido.

[0297] En ciertos casos, los procedimientos o usos se llevan a cabo en combinación con un agente que aumenta la eficacia de la célula efectora inmunitaria, por ejemplo, un agente tal como se describe en el presente documento.

[0298] En cualquiera de los procedimientos o usos mencionados anteriormente, la enfermedad asociada con la expresión del antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad proliferativa, una afección precancerosa, un cáncer y una indicación no relacionada con el cáncer asociada con la expresión del antígeno tumoral.

[0299] El cáncer puede ser un cáncer hematológico, por ejemplo, un cáncer elegido entre uno o más de leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemias agudas, leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica aguda de células B (B-ALL), leucemia linfocítica aguda de células T (T-ALL), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia prolinfocítica de células B, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, leucemia de células pilosas, linfoma folicular de células pequeñas o de células grandes, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma plasmablastico, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides, macroglobulinemia de Waldenström o preleucemia.

[0300] El cáncer también puede elegirse entre cáncer de colon, cáncer rectal, carcinoma de células renales, cáncer de hígado, carcinoma de células no pequeñas del pulmón, cáncer del intestino delgado, cáncer del esófago, melanoma, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer del pene, tumores sólidos de la infancia, cáncer de vejiga, cáncer del riñón o uréter, carcinoma del riñón, pelvis, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma pituitario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de células T, cánceres inducidos por el ambiente, combinaciones de dichos cánceres y lesiones metastásicas de dichos cánceres.

[0301] En ciertos casos de los procedimientos o usos descritos en el presente documento, la molécula CAR se administra en combinación con un agente que aumenta la eficacia de la célula efectora inmunitaria, por ejemplo, uno o más de un inhibidor de la proteína fosfatasa, un inhibidor de la quinasa, una citoquina, un inhibidor de una molécula inhibidora inmunitaria; o un agente que disminuye el nivel o la actividad de una célula T_{REG}.

[0302] En ciertos casos de los procedimientos o usos descritos en el presente documento, el inhibidor de la proteína fosfatasa es un inhibidor de SHP-1 y/o un inhibidor de SHP-2.

[0303] En otros casos de los procedimientos o usos descritos en el presente documento, el inhibidor de la quinasa se elige entre uno o más de un inhibidor de CDK4, un inhibidor de CDK4/6 (por ejemplo, palbociclib), un inhibidor de BTK (por ejemplo, ibrutinib o RN-486), un inhibidor de mTOR (por ejemplo, rapamicina o everolimus (RAD001)), un inhibidor de MNK o un inhibidor dual de P13K/mTOR. En una realización, el inhibidor de BTK no reduce ni inhibe la actividad de la quinasa de la quinasa inducible por interleucina-2 (ITK).

[0304] En otros casos de los procedimientos o usos descritos en el presente documento, el agente que inhibe la molécula inhibidora inmunitaria comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un ácido nucleico inhibidor, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR), una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción (TALEN) o una endonucleasa de dedo de zinc (ZFN) que inhibe la expresión de la molécula inhibidora.

[0305] En otros casos de los procedimientos o usos descritos en el presente documento, el agente que disminuye el nivel o la actividad de las células T_{REG} se elige entre ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, agotamiento de CD25 o una combinación de los mismos.

[0306] En ciertos casos de los procedimientos o usos descritos en el presente documento, la molécula inhibidora inmunitaria se selecciona del grupo que consiste en PD1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, TGFR beta, CEACAM-1, CEACAM-3 y CEACAM-5.

[0307] En otros casos, el agente que inhibe la molécula inhibidora comprende un primer polipéptido que comprende una molécula inhibidora o un fragmento de la misma y un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, y en donde el primer y segundo polipéptidos se expresan en las células inmunes que contienen CAR, en donde (i) el primer polipéptido comprende PD1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, TGFR beta, CEACAM-1, CEACAM-3 y CEACAM-5 o un fragmento de los mismos; y/o (ii) el segundo polipéptido comprende un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización primario y/o un dominio de señalización coestimulador. En un caso, el dominio de señalización primario comprende un dominio funcional de CD3 zeta; y/o el dominio de señalización coestimuladora comprende un dominio funcional de una proteína seleccionada entre 41BB, CD27 y CD28.

[0308] En otros casos, la citocina se elige entre IL-7, IL-15 o IL-21, o ambas.

[0309] En otros casos, la célula efectora inmunitaria que comprende la molécula CAR y una segunda, por ejemplo, cualquiera de las terapias combinadas descritas en el presente documento (por ejemplo, el agente que aumenta la eficacia de la célula efectora inmunitaria) se administran sustancialmente de manera simultánea o secuencial.

[0310] En otros casos, la célula inmunitaria que comprende la molécula CAR se administra en combinación con una molécula que se dirige a GITR y/o modula la función de GITR. En ciertos casos, la molécula que se dirige a GITR y/o modula la función de GITR se administra antes de la célula o población de células que expresan CAR, o antes de la aféresis.

[0311] En un caso, se utiliza una infusión de linfocitos, por ejemplo una infusión de linfocitos alogénicos, en el tratamiento del cáncer, en donde la infusión de linfocitos comprende al menos una célula que expresa CAR tal como se describe en el presente documento. En un caso, se utiliza una infusión de linfocitos autólogos en el tratamiento del cáncer, en donde la infusión de linfocitos autólogos comprende al menos una célula que expresa CAR descrita en el presente documento.

[0312] En un caso, la célula es una célula T y la célula T es deficiente en diacilglicerol quinasa (DGK). En un caso, la célula es una célula T y la célula T es deficiente en Ikaros. En una realización, la célula es una célula T y la célula T es deficiente tanto en DGK como en Ikaros.

[0313] En un caso, el procedimiento incluye administrar una célula que expresa la molécula CAR, tal como se describe en el presente documento, en combinación con un agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR, en donde el agente es una citocina, por ejemplo, IL-7, IL-15, IL-18, IL-21, o una combinación de las mismas. La citocina se puede administrar en combinación con, por ejemplo, simultáneamente o poco después de, la administración de la célula que expresa CAR. Alternativamente, la citocina se puede administrar después de un período prolongado de tiempo después de la administración de la célula que expresa CAR, por ejemplo, después de la evaluación de la respuesta del sujeto a la célula que expresa CAR. En un caso, la citocina se administra al sujeto simultáneamente (por ejemplo, se administra el mismo día) con o poco después de la administración (por ejemplo, se administra 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días después de la administración) de la célula o población de células descritas en el presente documento. En otros casos, la citocina se administra al sujeto después de un período de tiempo prolongado (por ejemplo, al menos 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 10 semanas o más) después de la administración de la célula o población de células descritas en el presente documento, o después de la evaluación de la respuesta del sujeto a la célula.

[0314] En otros casos, las células que expresan una molécula CAR se administran en combinación con un agente que mejora uno o más efectos secundarios asociados con la administración de una célula que expresa una molécula CAR. Los efectos secundarios asociados con la célula que expresa CAR pueden elegirse entre el síndrome de liberación de citocinas (CRS) o la linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH).

[0315] En los casos de cualquiera de los procedimientos o usos mencionados anteriormente, las células que expresan la molécula CAR se administran en combinación con un agente que trata la enfermedad asociada con la expresión del antígeno tumoral, por ejemplo, cualquiera de las segundas o terceras terapias descritas en el presente documento. Combinaciones de ejemplo adicionales incluyen una o más de las siguientes.

[0316] En otro caso, la célula que expresa la molécula CAR, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, se puede administrar en combinación con otro agente, por ejemplo, un inhibidor de quinasa y/o inhibidor de punto de control descrito en el presente documento. En un caso, una célula que expresa la molécula CAR puede expresar además otro agente, por ejemplo, un agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR.

[0317] Por ejemplo, en un caso, el agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora (por ejemplo, una molécula inhibidora inmunitaria). Los ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG-3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR beta.

[0318] En un caso, el agente que inhibe la molécula inhibidora es un ácido nucleico inhibidor que es un ARNbc, un ARNip o un ARNhc. En algunos casos, el ácido nucleico inhibidor está unido al ácido nucleico que codifica un componente de la molécula CAR. Por ejemplo, la molécula inhibidora puede expresarse en la célula que expresa CAR.

[0319] En otro caso, el agente que inhibe una molécula inhibidora, por ejemplo, es una molécula descrita en el presente documento, por ejemplo, un agente que comprende un primer polipéptido, por ejemplo, una molécula inhibidora, asociada con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento. En un caso, el agente comprende un primer polipéptido, por ejemplo, de una molécula inhibidora, tal como PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG-3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 o TGFR beta, o un fragmento de cualquiera de estos (por ejemplo, al menos una parte del dominio extracelular de cualquiera de estos), y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (por ejemplo, que comprende un dominio coestimulador (por ejemplo, 41BB, CD27 o CD28, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento) y/o un dominio de señalización primario (por ejemplo, un dominio de señalización CD3 zeta descrito en el presente documento). En un caso, el agente comprende un primer polipéptido de PD1 o un fragmento del mismo (por ejemplo, al menos una parte del dominio extracelular de PD1), y un segundo polipéptido de un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (por ejemplo, un dominio de señalización CD28 descrito en el presente documento y/o un dominio de señalización CD3 zeta descrito en el presente documento).

[0320] En un caso, la célula efectora inmunitaria que expresa CAR de la presente divulgación, por ejemplo, una célula T o una célula NK, se administra a un sujeto que ha recibido un trasplante de células madre previo, por ejemplo, un trasplante de células madre autólogas.

[0321] En un caso, la célula efectora inmunitaria que expresa CAR de la presente divulgación, por ejemplo, una célula T o células NK, se administra a un sujeto que ha recibido una dosis previa de melfalán.

[0322] En un caso, la célula que expresa una molécula CAR, por ejemplo, una molécula CAR descrita en el presente documento, se administra en combinación con un agente que aumenta la eficacia de una célula que expresa una molécula CAR, por ejemplo, un agente descrito en el presente documento.

[0323] En un caso, las células que expresan una molécula CAR, por ejemplo, una molécula CAR descrita en el presente documento, se administran en combinación con una dosis baja de un inhibidor de mTOR que mejora el sistema inmunitario. Si bien no se desea limitarse a ninguna teoría, se cree que el tratamiento con una dosis baja que mejora el sistema inmunitario (por ejemplo, una dosis que es insuficiente para suprimir por completo el sistema inmunitario pero suficiente para mejorar la función inmunitaria) está acompañado por una disminución de las células T positivas para PD-1 o un aumento de las células negativas para PD-1. Las células T positivas para PD-1, pero no las células T negativas para PD-1, pueden agotarse mediante la interacción con células que expresan un ligando PD-1, por ejemplo, PD-L1 o PD-L2.

[0324] En un caso, este enfoque se puede utilizar para optimizar el rendimiento de las células CAR descritas en el presente documento en el sujeto. Si bien no se desea limitarse a la teoría, se cree que, en un caso, se mejora el rendimiento de las células efectoras inmunitarias no modificadas, endógenas, por ejemplo, células T o células NK. Si bien no se desea limitarse a la teoría, se cree que, en un caso, se mejora el rendimiento de una célula que expresa CAR de antígeno diana. En otros casos, las células, por ejemplo, células T o células NK, que tienen o serán modificadas para expresar un CAR, se pueden tratar ex vivo mediante el contacto con una cantidad de un inhibidor de mTOR que aumenta el número de células efectoras inmunitarias PD1 negativas, por ejemplo, células T o aumenta la

relación de células efectoras inmunitarias PD1 negativas, por ejemplo, células T/células efectoras inmunitarias PD1 positivas, por ejemplo, células T.

[0325] En un caso, la administración de una dosis baja de un inhibidor de mTOR que mejora el sistema inmunitario, por ejemplo, un inhibidor alostérico, por ejemplo, RAD001, o un inhibidor catalítico, se inicia antes de la administración de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento, por ejemplo, células T o células NK. En un caso, las células CAR se administran después de un tiempo suficiente, o una dosificación suficiente, de un inhibidor de mTOR, de modo que el nivel de células efectoras inmunitarias PD1 negativas, por ejemplo, células T o células NK, o la relación de células efectoras inmunitarias PD1 negativas, por ejemplo, células T/células efectoras inmunitarias PD1 positivas, por ejemplo, células T, se ha incrementado, al menos de forma transitoria.

[0326] En un caso, la célula, por ejemplo, célula T o célula NK, que se va a modificar para expresar un CAR, se recoge después de un tiempo suficiente, o después de una dosificación suficiente de la dosis baja de un inhibidor de mTOR que mejora la inmunidad, de modo que el nivel de células efectoras inmunitarias PD1 negativas, por ejemplo, células T, o la relación de células efectoras inmunitarias PD1 negativas, por ejemplo, células T/células efectoras inmunitarias PD1 positivas, por ejemplo, células T, en el sujeto o recogidas del sujeto se ha incrementado, al menos de forma transitoria.

[0327] En un caso, la célula que expresa una molécula CAR, por ejemplo, una molécula CAR descrita en el presente documento, se administra en combinación con un agente que mejora uno o más efectos secundarios asociados con la administración de una célula que expresa una molécula CAR, por ejemplo, un agente descrito en el presente documento.

[0328] En un caso, la célula que expresa una molécula CAR, por ejemplo, una molécula CAR descrita en el presente documento, se administra en combinación con un agente que trata la enfermedad asociada con un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, un agente descrito en el presente documento.

[0329] En un caso, una célula que expresa dos o más moléculas CAR, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, se administra a un sujeto que la necesita para tratar el cáncer. En un caso, una población de células que incluye una célula que expresa CAR, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, se administra a un sujeto que la necesita para tratar el cáncer.

[0330] En un caso, la célula que expresa una molécula CAR, por ejemplo, una molécula CAR descrita en el presente documento, se administra a una dosis y/o programa de dosificación descritos en el presente documento.

[0331] En un caso, la molécula CAR se introduce en células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK), por ejemplo, utilizando transcripción *in vitro*, y el sujeto (por ejemplo, ser humano) recibe una administración inicial de células que comprenden una molécula CAR, y una o más administraciones posteriores de células que comprenden una molécula CAR, en donde la una o más administraciones posteriores se administran menos de 15 días, por ejemplo, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 días después de la administración anterior. En un caso, se administran más de una administración de células que comprenden una molécula CAR al sujeto (por ejemplo, humano) por semana, por ejemplo, se administran 2, 3 o 4 administraciones de células que comprenden una molécula CAR por semana. En un caso, el sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) recibe más de una administración de células que comprenden una molécula de CAR por semana (por ejemplo, 2, 3 o 4 administraciones por semana) (también denominado en el presente documento como un ciclo), seguido de una semana sin administración de células que comprenden una molécula de CAR, y a continuación se administran al sujeto una o más administraciones adicionales de células que comprenden una molécula de CAR (por ejemplo, más de una administración de las células que comprenden una molécula de CAR por semana). En otro caso, el sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) recibe más de un ciclo de células que comprenden una molécula de CAR, y el tiempo entre cada ciclo es inferior a 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 o 3 días. En un caso, las células que comprenden una molécula de CAR se administran cada dos días durante 3 administraciones por semana. En un caso, las células que comprenden una molécula de CAR se administran durante al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más semanas.

[0332] En un caso, las células que expresan una molécula CAR, por ejemplo, una molécula CAR descrita en el presente documento, se administran como un tratamiento de primera línea para la enfermedad, por ejemplo, el cáncer, por ejemplo, el cáncer descrito en el presente documento. En otro caso, las células que expresan una molécula CAR, por ejemplo, una molécula CAR descrita en el presente documento, se administran como un tratamiento de segunda, tercera, cuarta línea para la enfermedad, por ejemplo, el cáncer, por ejemplo, el cáncer descrito en el presente documento.

[0333] En un caso, se administra una población de células descrita en el presente documento.

[0334] La molécula de ácido nucleico aislada que codifica un CAR, la molécula de polipéptido aislada de un CAR, el vector que comprende un CAR y la célula que comprende un CAR pueden usarse como medicamento.

[0335] La molécula de ácido nucleico aislada que codifica un CAR, la molécula de polipéptido aislada de un CAR, el

vector que comprende un CAR y la célula que comprende un CAR pueden usarse en el tratamiento de una enfermedad que expresa un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento.

[0336] Una célula que expresa una molécula CAR descrita en el presente documento puede utilizarse como medicamento en combinación con una citocina, por ejemplo, IL-7, IL-15 y/o IL-21, tal como se describe en el presente documento. Una citocina descrita en el presente documento puede utilizarse como medicamento en combinación con una célula que expresa una molécula CAR descrita en el presente documento.

[0337] Una célula que expresa una molécula CAR descrita en el presente documento puede utilizarse como medicamento en combinación con un inhibidor de quinasa y/o un inhibidor de punto de control, tal como se describe en el presente documento. Un inhibidor de quinasa y/o un inhibidor de punto de control descritos en el presente documento puede utilizarse como medicamento en combinación con una célula que expresa una molécula CAR descrita en el presente documento.

[0338] Una célula que expresa una molécula de CAR descrita en el presente documento puede utilizarse en combinación con una citocina, por ejemplo, IL-7, IL-15 y/o IL-21, tal como se describe en el presente documento, en el tratamiento de una enfermedad que expresa un antígeno tumoral al que se dirige el CAR. Una citocina descrita en el presente documento puede utilizarse, en combinación con una célula que expresa una molécula de CAR descrita en el presente documento, en el tratamiento de una enfermedad que expresa un antígeno tumoral al que se dirige el CAR.

[0339] Una célula que expresa una molécula CAR descrita en el presente documento puede utilizarse en combinación con un inhibidor de quinasa y/o un inhibidor de punto de control, tal como se describen en el presente documento, en el tratamiento de una enfermedad que expresa un antígeno tumoral al que se dirige el CAR. Un inhibidor de quinasa y/o un inhibidor de punto de control descritos en el presente documento pueden utilizarse, en combinación con una célula que expresa una molécula CAR descrita en el presente documento, en el tratamiento de una enfermedad que expresa un antígeno tumoral al que se dirige el CAR.

[0340] Se puede administrar una molécula de CAR, por ejemplo, una molécula de CAR descrita en el presente documento, o una célula que comprende un ácido nucleico que codifica una molécula de CAR, por ejemplo, una molécula de CAR descrita en el presente documento. El sujeto puede tener un trastorno descrito en el presente documento, por ejemplo, el sujeto tiene cáncer, por ejemplo, el sujeto tiene un cáncer y tiene células de soporte al tumor que expresan un antígeno de soporte al tumor descrito en el presente documento. El sujeto puede ser un ser humano.

[0341] Un sujeto que tiene una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno de soporte al tumor, tal como se describe en el presente documento, puede ser tratado comprendiendo la administración al sujeto de una cantidad efectiva de una célula que comprende una molécula CAR, por ejemplo, una molécula CAR descrita en el presente documento.

[0342] Se puede tratar un sujeto que tiene una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno de soporte al tumor, lo que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una célula, por ejemplo, una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, una población de células efectoras inmunitarias) que comprende una molécula CAR, en donde la molécula CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio intracelular, dicho dominio intracelular comprende un dominio coestimulador y/o un dominio de señalización primario, en donde dicho dominio de unión a antígeno se une al antígeno de soporte al tumor asociado con la enfermedad, por ejemplo, un antígeno de soporte al tumor, tal como se describe en el presente documento.

[0343] Una composición que comprende una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, una población de células efectoras inmunitarias) que comprende una molécula CAR (por ejemplo, una molécula CAR tal como se describe en el presente documento) puede usarse en el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno de soporte al tumor, por ejemplo, un trastorno tal como se describe en el presente documento.

[0344] En cualquiera de los procedimientos o usos mencionados anteriormente, la enfermedad asociada con la expresión del antígeno de soporte al tumor se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad proliferativa, una afección precancerosa, un cáncer y una indicación no relacionada con el cáncer asociada con la expresión del antígeno de soporte al tumor. En un caso, la enfermedad asociada con un antígeno de soporte al tumor descrito en el presente documento es un tumor sólido.

[0345] En un caso de los procedimientos o usos descritos en el presente documento, la molécula CAR se administra en combinación con otro agente. En una realización, el agente puede ser un inhibidor de quinasa, por ejemplo, un inhibidor de CDK4/6, un inhibidor de BTK, un inhibidor de mTOR, un inhibidor de MNK o un inhibidor dual de PI3K/mTOR, y combinaciones de los mismos. En un caso, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de CDK4, por ejemplo, un inhibidor de CDK4 descrito en el presente documento, por ejemplo, un inhibidor de CD4/6, tal como, por ejemplo, 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H - pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-ona, clorhidrato

(también denominado palbociclib o PD0332991). En un caso, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de BTK, por ejemplo, un inhibidor de BTK descrito en el presente documento, tal como, por ejemplo, ibrutinib. En un caso, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de mTOR, por ejemplo, un inhibidor de mTOR descrito en el presente documento, tal como, por ejemplo, rapamicina, un análogo de rapamicina, OSI-027. El inhibidor de mTOR puede ser, por ejemplo, un inhibidor de mTORC1 y/o un inhibidor de mTORC2, por ejemplo, un inhibidor de mTORC1 y/o un inhibidor de mTORC2 descrito en el presente documento. En un caso, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de MNK, por ejemplo, un inhibidor de MNK descrito en el presente documento, tal como, por ejemplo, 4-amino-5-(4-fluoroanilino)-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina. El inhibidor de MNK puede ser, por ejemplo, un inhibidor de MNK1a, MNK1b, MNK2a y/o MNK2b. El inhibidor dual de PI3K/mTOR puede ser, por ejemplo, PF-04695102.

[0346] En un caso de los procedimientos o usos descritos en el presente documento, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de CDK4 seleccionado entre aloisina A; flavopiridol o HMR-1275, 2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-[(3*S*,4*R*)-3-hidroxi-1-metil-4-piperidinil]-4-cromenona; crizotinib (PF-02341066; 2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-[(2*R*,3*S*)-2-(hidroximetil)-1-metil-3-pirrolidinil]-4*H*-1-benzopiran-4-ona, clorhidrato (P276-00); 1-metil-5-[[2-[5-(trifluorometil)-1*H*-imidazol-2-il]-4-piridinil]oxi]-*N*-[4-(trifluorometil)fenil]-1*H*-bencimidazol-2-amina (RAF265); indisulam (E7070); roscovitina (CYC202); palbociclib (PD0332991); dinaciclib (SCH727965); *N*-[5-[[5-(terc-butiloxazol-2-il)metil]tio]tiazol-2-il]piperidin-4-carboxamida (BMS 387032); ácido 4-[[9-cloro-7-(2,6-difluorofenil)-5*H*-pirimido[5,4-*d*][2]benzazepin-2-il]amino]-benzoico (MLN8054); 5-[3-(4,6-difluoro-1*H*-bencimidazol-2-il)-1*H*-indazol-5-il]-*N*-etil-4-metil-3-piridinametanamina (AG-024322); *N*-(piperidin-4-il)amida del ácido 4-(2,6-diclorobenzoilamino)-1*H*-pirazol-3-carboxílico (AT7519); 4-[2-metil-1-(1-metiletil)-1*H*-imidazol-5-il]-*N*-[4-(metilsulfonyl)fenil]-2-pirimidinamina (AZD5438); y XL281 (BMS908662).

[0347] En un caso de los procedimientos o usos descritos en el presente documento, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de CDK4, por ejemplo, palbociclib (PD0332991), y el palbociclib se administra en una dosis de aproximadamente 50 mg, 60 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 105 mg, 110 mg, 115 mg, 120 mg, 125 mg, 130 mg, 135 mg (por ejemplo, 75 mg, 100 mg o 125 mg) diariamente durante un período de tiempo, por ejemplo, diariamente durante 14-21 días de un ciclo de 28 días, o diariamente durante 7-12 días de un ciclo de 21 días. En un caso, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de palbociclib.

[0348] En un caso de los procedimientos o usos descritos en el presente documento, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de BTK seleccionado entre ibrutinib (PCI-32765); GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774; y LFM-A13. En un caso, el inhibidor de BTK no reduce ni inhibe la actividad de quinasa de la quinasa inducible por interleucina-2 (ITK), y se selecciona entre GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774; y LFM-A13.

[0349] En un caso de los procedimientos o usos descritos en el presente documento, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de BTK, por ejemplo, ibrutinib (PCI-32765), y el ibrutinib se administra en una dosis de aproximadamente 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 420 mg, 440 mg, 460 mg, 480 mg, 500 mg, 520 mg, 540 mg, 560 mg, 580 mg, 600 mg (por ejemplo, 250 mg, 420 mg o 560 mg) diariamente durante un período de tiempo, por ejemplo, diariamente durante un ciclo de 21 días o diariamente durante un ciclo de 28 días. En un caso, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de ibrutinib.

[0350] En un caso de los procedimientos o usos descritos en el presente documento, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de BTK que no inhibe la actividad de quinasa de ITK, por ejemplo, RN-486, y RN-486 se administra en una dosis de aproximadamente 100 mg, 110 mg, 120 mg, 130 mg, 140 mg, 150 mg, 160 mg, 170 mg, 180 mg, 190 mg, 200 mg, 210 mg, 220 mg, 230 mg, 240 mg, 250 mg (por ejemplo, 150 mg, 200 mg o 250 mg) diariamente durante un período de tiempo, por ejemplo, diariamente un ciclo de 28 días. En una realización, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más ciclos de RN-486.

[0351] En un caso de los procedimientos o usos descritos en el presente documento, el inhibidor de la quinasa es un inhibidor de mTOR seleccionado entre temsirolimus; ridaforolimus dimetilfosfinato de (1*R*,2*R*,4*S*)-4-[(2*R*)-2-[(1*R*,9*S*,12*S*,15*R*,16*E*,18*R*,19*R*,21*R*, 23*S*,24*E*,26*E*,28*Z*,30*S*,32*S*,35*R*)-1,18-dihidroxi-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-2,3,10,14,20-pentaoxo-11,36-dioxa-4-azatriciclo[30.3.1.0^{4,9}] hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il]propil]-2-metoxiciclohexilo, también conocido como AP23573 y MK8669; everolimus (RAD001); rapamicina (AY22989); simapimod; (5-{2,4-bis[(3*S*)-3-metilmorfolin-4-il]pírido[2,3-*d*]pirimidin-7-il}-2-metoxifenil)metanol (AZD8055); 2-amino-8-[trans-4-(2-hidroxi-etoxi)ciclohexil]-6-(6-metoxi-3-piridinil)-4-metil-pirido[2,3-*d*]pirimidin-7(8*H*)-ona (PF04691502); y *N*²-[1,4-dioxo-4-[[4-(4-oxo-8-fenil-4*H*-1-benzopiran-2-il)morfolinio-4-il]metoxi]butil]-L-arginilglicil-L- α -aspartil-L-serina-, sal interna (SF1126); y XL765.

[0352] En un caso de los procedimientos o usos descritos en el presente documento, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de mTOR, por ejemplo, rapamicina, y la rapamicina se administra en una dosis de aproximadamente 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg (por ejemplo, 6 mg) diariamente durante un período de tiempo, por ejemplo, diariamente durante un ciclo de 21 días o diariamente durante un ciclo de 28 días. En una realización, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de rapamicina. En un caso, el inhibidor de la quinasa es un inhibidor de mTOR, por ejemplo, everolimus, y el everolimus se administra en una dosis de aproximadamente 2 mg, 2,5 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 11 mg, 12 mg, 13 mg, 14 mg, 15 mg (por ejemplo, 10 mg)

diariamente durante un período de tiempo, por ejemplo, diariamente durante un ciclo de 28 días. En un caso, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de everolimus.

5 [0353] En un caso de los procedimientos o usos descritos en el presente documento, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de MNK seleccionado entre CGP052088; 4-amino-3-(p-fluorofenilamino)-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina (CGP57380); cercosporamida; ETC-1780445-2; y 4-amino-5-(4-fluoroanilino)-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina.

10 [0354] En un caso de los procedimientos o usos descritos en el presente documento, el inhibidor de quinasa es un inhibidor dual de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y mTOR seleccionado entre 2-amino-8-[trans-4-(2-hidroxietoxi)ciclohexil]-6-(6-metoxi-3-piridinil)-4-metil-pirido[2,3-*d*]pirimidin-7(8*H*)-ona (PF-04691502); *N*-[4-[[4-(Dimetilamino)-1-piperidinil]carbonil]fenil]-*N'*-[4-(4,6-di-4-morfolinil-1,3,5-triazin-2-il)fenil]urea (PF-05212384, PKI-587); 2-metil-2-[4-[3-metil-2-oxo-8-(quinolin-3-il)-2,3-dihidro-1*H*-imidazo[4,5-*c*]quinolin-1-il]fenil]propanonitrilo (BEZ-235); apitolisib (GDC-0980, RG7422); 2,4-difluoro-*N*-{2-(metiloxi)-5-[4-(4-piridazinil)-6-quinolinil]-3-piridinil}bencenosulfonamida (GSK2126458); ácido 8-(6-metoxipiridin-3-il)-3-metil-1-(4-(piperazin-1-il)-3-(trifluorometil)fenil)-1*H*-imidazo[4,5-*c*]quinolin-2(3*H*)-ona maleico (NVP-BGT226); 3-[4-(4-Morfolinil)pirido[3',2':4,5]furo[3,2-*d*]pirimidin-2-il]fenol (PI-103); 5-(9-isopropil-8-metil-2-morfolino-9*H*-purin-6-il)pirimidin-2-amina (VS-5584, SB2343); y *N*-[2-[(3,5-Dimetoxifenil)amino]quinoxalin-3-il]-4-[(4-metil-3-metoxifenil)carbonil]aminofenilsulfonamida (XL765).

20 [0355] En un caso de los procedimientos o usos descritos en el presente documento, una célula efectora inmunitaria que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa, por ejemplo, un inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa descrito en el presente documento. En una realización, el inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa es un inhibidor de SHP-1, por ejemplo, un inhibidor de SHP-1 descrito en el presente documento, tal como, por ejemplo, estibogluconato de sodio. En una
25 realización, el inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa es un inhibidor de SHP-2.

[0356] En un caso de los procedimientos o usos descritos en el presente documento, la molécula CAR se administra en combinación con otro agente, y el agente es una citocina. La citocina puede ser, por ejemplo, IL-7, IL-15, IL-21 o una combinación de las mismas. En otro caso, la molécula CAR se administra en combinación con un inhibidor de puntos de control, por ejemplo, un inhibidor de puntos de control descrito en el presente documento. Por ejemplo, en un caso, el inhibidor de puntos de control inhibe una molécula inhibidora seleccionada entre PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG-3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR beta.

35 [0357] En un aspecto, el CAR descrito en el presente documento se puede utilizar para erradicar una célula normal que expresa un antígeno tumoral, tal como se describe en el presente documento, por lo que es aplicable para su uso como terapia de acondicionamiento celular antes del trasplante de células. En un aspecto, la célula normal que expresa un antígeno tumoral, tal como se describe en el presente documento, es una célula madre normal y el trasplante de células es un trasplante de células madre.

40 **Aplicación terapéutica**

[0358] Se describe el tratamiento de un sujeto, por ejemplo, la reducción o mejora de una afección o trastorno hiperproliferativo (por ejemplo, un cáncer), por ejemplo, un tumor sólido, un tumor de tejido blando o una lesión metastásica, en un sujeto. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cáncer" pretende incluir todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados de forma maligna, independientemente del tipo histopatológico o la etapa de invasividad. Los ejemplos de tumores sólidos incluyen neoplasias malignas, por ejemplo, sarcomas, adenocarcinomas y carcinomas, de los diversos sistemas orgánicos, tales como los que afectan al hígado, pulmón, mama, sistema linfático, tracto gastrointestinal (por ejemplo, colon), tracto genitourinario (por ejemplo, células renales, uroteliales), próstata y faringe. Los adenocarcinomas incluyen neoplasias malignas, tales como la mayoría de los cánceres de colon, cáncer rectal, carcinoma de células renales, cáncer de hígado, carcinoma de células no pequeñas de pulmón, cáncer de intestino delgado y cáncer de esófago. En una realización, el cáncer es un melanoma, por ejemplo, un melanoma en etapa avanzada. Las lesiones metastásicas de los cánceres mencionados anteriormente también se pueden tratar o prevenir
55 utilizando los procedimientos y composiciones divulgados en el presente documento. Ejemplos de otros cánceres que pueden ser tratados incluyen cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer del pene, leucemias crónicas o agudas incluyendo leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de células T,
65

cánceres inducidos por el medio ambiente, incluidos los inducidos por asbesto, y combinaciones de dichos cánceres. El tratamiento de cánceres metastásicos, por ejemplo, cánceres metastásicos que expresan PD-L1 (Iwai et al. (2005) Int. Immunol. 17:133-144) se puede efectuar utilizando las moléculas de anticuerpos descritas en el presente documento.

[0359] Los cánceres de ejemplo cuyo crecimiento puede inhibirse incluyen cánceres que responden típicamente a la inmunoterapia. Los ejemplos no limitantes de cánceres para el tratamiento incluyen melanoma (por ejemplo, melanoma maligno metastásico), cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células claras), cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata refractario a hormonas), cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas). Además, las neoplasias malignas refractarias o recurrentes pueden tratarse utilizando las moléculas descritas en el presente documento.

[0360] Se describe un vector que comprende un CAR unido operativamente a un promotor para su expresión en células efectoras inmunitarias de mamíferos (por ejemplo, células T, células NK). Una célula efectora inmunitaria recombinante que expresa un CAR, tal como se describe en el presente documento, puede utilizarse para tratar el cáncer expresando un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento. Las células que expresan CAR tal como se describe en el presente documento pueden ser capaces de ponerse en contacto con una célula tumoral con al menos un antígeno asociado al cáncer expresado en su superficie, de modo que la célula que expresa CAR se dirige a la célula cancerosa y se inhibe el crecimiento del cáncer.

[0361] El crecimiento de un cáncer se puede inhibir, lo que comprende poner en contacto la célula cancerosa con una célula que expresa CAR de la presente invención, de modo que el CART se active en respuesta al antígeno y se dirija a la célula cancerosa, en donde se inhibe el crecimiento del tumor.

[0362] La divulgación se refiere al tratamiento del cáncer en un sujeto. El procedimiento comprende administrar al sujeto una célula que expresa CAR de la presente divulgación de modo que se trate el cáncer en el sujeto. En un aspecto, el cáncer asociado con la expresión de un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento es un cáncer hematológico. En un aspecto, el cáncer hematológico es una leucemia o un linfoma. En un aspecto, un cáncer asociado con la expresión de un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento incluye cánceres y neoplasias malignas que incluyen, pero sin limitarse a las mismas, por ejemplo, una o más leucemias agudas que incluyen, pero sin limitarse a las mismas, por ejemplo, leucemia linfocítica aguda de células B ("BALL"), leucemia linfocítica aguda de células T ("TALL"), leucemia linfocítica aguda (ALL); una o más leucemias crónicas que incluyen, pero sin limitarse a las mismas, por ejemplo, leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL). Otros cánceres o afecciones hematológicas adicionales asociadas con la expresión de un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento incluyen, pero sin limitarse a los mismos, por ejemplo, leucemia prolinfocítica de células B, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, leucemia de células pilosas, linfoma folicular de células pequeñas o de células grandes, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma plasmoblástico, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides, macroglobulinemia de Waldenström y "preleucemia", que son una colección diversa de afecciones hematológicas unidas por la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides, y similares. Además, una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento incluye, pero sin limitarse a las mismas, por ejemplo, cánceres atípicos y/o no clásicos, neoplasias malignas, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas asociadas con la expresión de un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento.

[0363] En algunos casos, un cáncer que puede tratarse con células que expresan CAR de la presente divulgación es el mieloma múltiple. En general, se cree que las células de mieloma son negativas mediante expresión por citometría de flujo para un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento. Por lo tanto, en algunos casos, un CAR CD19, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, puede usarse para dirigirse a las células de mieloma. En algunos casos, los CAR como se describen en el presente documento pueden usarse en combinación con una o más terapias adicionales, por ejemplo, tratamiento con lenalidomida.

[0364] La divulgación incluye un tipo de terapia celular en la que las células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK) se modifican genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) y la célula T o célula NK que expresa CAR se infunde a un receptor que lo necesita. La célula infundida puede matar células tumorales en el receptor. A diferencia de las terapias con anticuerpos, las células efectoras inmunitarias modificadas con CAR (por ejemplo, células T, células NK) pueden replicarse in vivo, lo que da como resultado una persistencia a largo plazo que puede conducir a un control tumoral sostenido. En varios casos, las células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK) administradas al paciente, o su progenie, persisten en el paciente durante al menos cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, trece meses, catorce meses, quince meses, dieciséis meses, diecisiete meses, dieciocho meses, diecinueve meses, veinte meses, veintiún meses, veintidós meses, veintitrés meses, dos años, tres años, cuatro años o cinco años después de la administración de la célula T o la célula NK al paciente.

[0365] La divulgación también incluye un tipo de terapia celular en la que las células efectoras inmunitarias (por

ejemplo, células T, células NK) se modifican, por ejemplo, mediante ARN transcrito in vitro, para expresar transitoriamente un receptor de antígeno quimérico (CAR) y la célula T CAR o célula NK se infunde a un receptor que lo necesita. La célula infundida es capaz de matar células tumorales en el receptor. Por lo tanto, en varios aspectos, las células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK) administradas al paciente están presentes durante menos de un mes, por ejemplo, tres semanas, dos semanas, una semana, después de la administración de la célula T o célula NK al paciente.

[0366] Sin querer limitarse a ninguna teoría en particular, la respuesta inmunitaria antitumoral provocada por las células efectoras inmunitarias modificadas con CAR (por ejemplo, células T, células NK) puede ser una respuesta inmunitaria activa o pasiva, o alternativamente puede deberse a una respuesta inmunitaria directa o indirecta. En un aspecto, las células efectoras inmunitarias transducidas con CAR (por ejemplo, células T, células NK) exhiben secreción de citocinas proinflamatorias específicas y una potente actividad citolítica en respuesta a células cancerosas humanas que expresan un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento, resisten la inhibición soluble de un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento, median la muerte de células presentes y median la regresión de un tumor humano establecido. Por ejemplo, las células tumorales sin antígeno dentro de un campo heterogéneo de un tumor que expresa un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento pueden ser susceptibles a la destrucción indirecta por células efectoras inmunitarias redirigidas por un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, células T, células NK) que han reaccionado previamente contra células cancerosas adyacentes positivas al antígeno.

[0367] En un aspecto, las células efectoras inmunitarias modificadas con CAR completamente humanas (por ejemplo, células T, células NK) pueden ser un tipo de vacuna para inmunización ex vivo y/o terapia in vivo en un mamífero. En un aspecto, el mamífero es un ser humano.

[0368] Con respecto a la inmunización ex vivo, al menos uno de los siguientes ocurre in vitro antes de administrar la célula a un mamífero: i) expansión de las células, ii) introducción de un ácido nucleico que codifica un CAR en las células o iii) crioconservación de las células.

[0369] Los procedimientos ex vivo son bien conocidos en la técnica y se analizan con más detalle a continuación. De manera resumida, las células se aíslan de un mamífero (por ejemplo, un ser humano) y se modifican genéticamente (es decir, se transducen o transfectan in vitro) con un vector que expresa un CAR descrito en el presente documento. La célula modificada con CAR se puede administrar a un receptor mamífero para proporcionar un beneficio terapéutico. El receptor mamífero puede ser un ser humano y la célula modificada con CAR puede ser autóloga con respecto al receptor. Alternativamente, las células pueden ser alogénicas, singénicas o xenogénicas con respecto al receptor.

[0370] El procedimiento para la expansión ex vivo de células madre y progenitoras hematopoyéticas descrito en la Patente de Estados Unidos No. 5,199,942, se puede aplicar a las células de la presente invención. Se conocen otros procedimientos adecuados en la técnica, por lo tanto, la presente invención no se limita a ningún procedimiento particular de expansión ex vivo de las células. De manera resumida, el cultivo ex vivo y la expansión de células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK) comprende: (1) recolectar células madre y progenitoras hematopoyéticas CD34+ de un mamífero a partir de la recolección de sangre periférica o explantes de médula ósea; y (2) expandir dichas células ex vivo. Además de los factores de crecimiento celular descritos en la Patente de Estados Unidos No. 5,199,942, otros factores, tales como flt3-L, IL-1, IL-3 y el ligando c-kit, pueden utilizarse para el cultivo y expansión de las células.

[0371] Además de utilizar una vacuna basada en células en términos de inmunización ex vivo, la presente divulgación también proporciona composiciones y procedimientos para la inmunización in vivo para provocar una respuesta inmune dirigida contra un antígeno en un paciente.

[0372] En general, las células activadas y expandidas tal como se describe en el presente documento pueden utilizarse en el tratamiento y prevención de enfermedades que surgen en individuos inmunocomprometidos. En particular, las células efectoras inmunitarias modificadas con CAR (por ejemplo, células T, células NK) tal como se describe en el presente documento pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones asociadas con la expresión de un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento. En ciertos aspectos, las células se utilizan en el tratamiento de pacientes en riesgo de desarrollar enfermedades, trastornos y afecciones asociadas con la expresión de un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento. Por lo tanto, la presente divulgación se refiere a procedimientos para el tratamiento o prevención de enfermedades, trastornos y afecciones asociadas con la expresión de un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento que comprenden administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de las células efectoras inmunitarias modificadas con CAR (por ejemplo, células T, células NK).

[0373] En un aspecto, las células que expresan CAR descritas en el presente documento pueden usarse para tratar una enfermedad proliferativa, tal como un cáncer o una neoplasia maligna, o una afección precancerosa, tal como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia. Además, una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento incluye, pero sin limitarse a las mismas, por ejemplo, cánceres atípicos y/o no clásicos, neoplasias malignas, afecciones precancerosas o

enfermedades proliferativas que expresan un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento. Las indicaciones no relacionadas con el cáncer asociadas con la expresión de un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento incluyen, pero sin limitarse a las mismas, por ejemplo, enfermedad autoinmune (por ejemplo, lupus), trastornos inflamatorios (alergia y asma) y trasplante.

[0374] Las células efectoras inmunitarias modificadas con CAR (por ejemplo, células T, células NK) tal como se describe en el presente documento se pueden administrar solas o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes, tales como IL-2 u otras citocinas o poblaciones de células.

10 *Cáncer hematológico*

[0375] Las afecciones de cáncer hematológico son los tipos de cáncer, tales como leucemia, linfoma y afecciones linfoproliferativas malignas que afectan la sangre, la médula ósea y el sistema linfático.

[0376] La leucemia se puede clasificar como leucemia aguda y leucemia crónica. La leucemia aguda se puede clasificar además como leucemia mieloide aguda (AML) y leucemia linfóide aguda (ALL). La leucemia crónica incluye leucemia mieloide crónica (CML) y leucemia linfóide crónica (LLC). Otras afecciones relacionadas incluyen síndromes mielodisplásicos (MDS, anteriormente conocidos como "preleucemia") que son una colección diversa de afecciones hematológicas unidas por la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides y el riesgo de transformación en AML.

[0377] El linfoma es un grupo de tumores de células sanguíneas que se desarrollan a partir de linfocitos. Los linfomas de ejemplo incluyen el linfoma no Hodgkin y el linfoma de Hodgkin.

[0378] La presente divulgación también se refiere a la inhibición de la proliferación o reducción de una población de células que expresan un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento, que comprende poner en contacto una población de células que comprende una célula que expresa un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento con una célula T que expresa CAR o una célula NK descrita en el presente documento que se une a una célula que expresa un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento. En un aspecto específico, la presente divulgación se refiere a la inhibición de la proliferación o reducción de la población de células cancerosas que expresan un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento, que comprende poner en contacto una población de células cancerosas que expresan un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento con una célula T que expresa CAR o una célula NK descrita en el presente documento que se une a una célula que expresa un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento. En un caso, la presente divulgación se refiere a la inhibición de la proliferación o reducción de la población de células cancerosas que expresan un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento, que comprende poner en contacto una población de células cancerosas que expresan un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento con una célula T que expresa CAR o una célula NK descrita en el presente documento que se une a una célula que expresa un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento. En ciertos casos, una célula T que expresa CAR o una célula NK descrita en el presente documento reduce la cantidad, el número, la cantidad o el porcentaje de células y/o células cancerosas en al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 65 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % en un sujeto con o un modelo animal de leucemia mieloide u otro cáncer asociado con células que expresan un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento en relación con un control negativo. En un aspecto, el sujeto es un ser humano.

[0379] La presente divulgación también se refiere a la prevención, el tratamiento y/o el manejo de una enfermedad asociada con células que expresan un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, un cáncer hematológico o un cáncer atípico que expresa un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento), que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una célula CAR T o una célula NK descrita en el presente documento que se une a una célula que expresa un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento. En un aspecto, el sujeto es un ser humano. Los ejemplos no limitantes de trastornos asociados con células que expresan un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento incluyen trastornos autoinmunes (tales como lupus), trastornos inflamatorios (tales como alergias y asma) y cánceres (tales como cánceres hematológicos o cánceres atípicos que expresan un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento).

[0380] La presente divulgación también se refiere a la prevención, el tratamiento y/o el manejo de una enfermedad asociada con células que expresan un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una célula CAR T o una célula NK descrita en el presente documento que se une a una célula que expresa un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento. En un aspecto, el sujeto es un ser humano.

[0381] La presente divulgación también se refiere a la prevención de la recaída del cáncer asociado con células que expresan un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una célula T CAR o una célula NK descrita en el presente documento que se une a una

célula que expresa un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento. En un aspecto, los procedimientos comprenden administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una célula T que expresa CAR o una célula NK descrita en el presente documento que se une a una célula que expresa un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en el presente documento en combinación con una cantidad eficaz de otra terapia.

Composiciones y tratamientos farmacéuticos

[0382] Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden comprender una célula que expresa CAR, por ejemplo, una pluralidad de células que expresan CAR, tal como se describe en el presente documento, en combinación con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden comprender tampones, tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos, tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos, tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes, tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente divulgación están en un aspecto formuladas para administración intravenosa.

[0383] Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden administrarse de una manera apropiada para la enfermedad que se va a tratar (o prevenir). La cantidad y frecuencia de administración se determinarán por factores, tales como la condición del paciente y el tipo y gravedad de la enfermedad del paciente, aunque las dosis apropiadas pueden determinarse mediante ensayos clínicos.

[0384] En un caso, la composición farmacéutica está sustancialmente libre de, por ejemplo, no hay niveles detectables de un contaminante, por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en endotoxina, micoplasma, lentivirus competente para la replicación (RCL, *Replication competent lentivirus*), p24, ácido nucleico VSV-G, gag de VIH, microesferas recubiertas de anti-CD3/anti-CD28 residuales, anticuerpos de ratón, suero humano agrupado, albúmina de suero bovino, suero bovino, componentes de medios de cultivo, células de empaquetamiento de vectores o componentes de plásmidos, una bacteria y un hongo. En un caso, la bacteria es al menos una seleccionada del grupo que consiste en *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia* y *Streptococcus pyogenes* grupo A.

[0385] Cuando se indica "una cantidad inmunológicamente eficaz", "una cantidad antitumoral eficaz", "una cantidad inhibidora de tumores eficaz" o "cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones de la presente invención que se va a administrar puede ser determinada por un médico teniendo en cuenta las diferencias individuales en edad, peso, tamaño del tumor, grado de infección o metástasis y condición del paciente (sujeto). En general, se puede afirmar que una composición farmacéutica que comprende las células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK) descritas en el presente documento se puede administrar a una dosis de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, en algunos casos de 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, incluidos todos los valores enteros dentro de esos intervalos. Las composiciones de células T también se pueden administrar varias veces a estas dosis. Las células se pueden administrar mediante técnicas de infusión que se conocen comúnmente en inmunoterapia (véase, por ejemplo, Rosenberg et al., *New Eng. J. de Med.* 319:1676, 1988).

[0386] En ciertos aspectos, puede ser deseable administrar células efectoras inmunitarias activadas (por ejemplo, células T, células NK) a un sujeto y, a continuación, volver a extraer sangre (o realizar una aféresis), activar las células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK) de la misma de acuerdo con la presente divulgación y reinfundir al paciente con estas células efectoras inmunitarias activadas y expandidas (por ejemplo, células T, células NK). Este proceso puede llevarse a cabo varias veces cada pocas semanas. En ciertos aspectos, las células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK) pueden activarse a partir de extracciones de sangre de 10 cc a 400 cc. En ciertos aspectos, las células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK) se activan a partir de extracciones de sangre de 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc o 100 cc.

[0387] La administración de las composiciones de la presente invención se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente, incluyendo por inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Las composiciones descritas en el presente documento se pueden administrar a un paciente por vía transarterial, subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, por inyección intravenosa (iv) o intraperitoneal. En un aspecto, las composiciones de células T de la presente invención se administran a un paciente por inyección intradérmica o subcutánea. En un aspecto, las composiciones de células T de la presente invención se administran mediante inyección i.v. Las composiciones de células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK) se pueden inyectar directamente en un tumor, ganglio linfático o sitio de infección.

[0388] En un aspecto de ejemplo particular, los sujetos pueden someterse a leucoféresis, en la que los leucocitos se recogen, enriquecen o agotan ex vivo para seleccionar y/o aislar las células de interés, por ejemplo, células T. Estos aislados de células T pueden expandirse mediante procedimientos conocidos en la técnica y tratarse de manera que se puedan introducir una o más construcciones de CAR descritas en el presente documento, creando así una célula T CAR descrita en el presente documento. Los sujetos que lo necesitan pueden someterse posteriormente a un tratamiento estándar con quimioterapia de dosis alta seguida de un trasplante de células madre de sangre periférica.

En ciertos aspectos, después o simultáneamente con el trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células T CAR expandidas de la presente invención. En un aspecto adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

[0389] La dosis de los tratamientos anteriores que se administrarán a un paciente variará con la naturaleza precisa de la afección que se esté tratando y el receptor del tratamiento. La escala de dosis para la administración humana se puede realizar de acuerdo con las prácticas aceptadas en la técnica. La dosis para CAMPATH, por ejemplo, generalmente estará en el rango de 1 a aproximadamente 100 mg para un paciente adulto, generalmente administrada diariamente durante un período de entre 1 y 30 días. La dosis diaria preferida es de 1 a 10 mg por día, aunque en algunos casos se pueden usar dosis mayores de hasta 40 mg por día (descritas en la Patente de Estados Unidos N.º 6.120.766).

[0390] En un caso, el CAR se introduce en células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK), por ejemplo, utilizando transcripción in vitro, y el sujeto (por ejemplo, humano) recibe una administración inicial de células efectoras inmunitarias CAR (por ejemplo, células T, células NK) descritas en el presente documento, y una o más administraciones posteriores de las células efectoras inmunitarias con CAR (por ejemplo, células T, células NK) descritas en el presente documento, en donde una o más administraciones posteriores se administran menos de 15 días, por ejemplo, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 días después de la administración anterior. En un caso, se administran más de una administración de células efectoras inmunitarias con CAR (por ejemplo, células T, células NK) al sujeto (por ejemplo, humano) por semana, por ejemplo, se administran 2, 3 o 4 administraciones de las células efectoras inmunitarias con CAR (por ejemplo, células T, células NK) descritas en el presente documento por semana. En un caso, el sujeto (por ejemplo, sujeto humano) recibe más de una administración de células efectoras inmunitarias con CAR (por ejemplo, células T, células NK) por semana (por ejemplo, 2, 3 o 4 administraciones por semana) (también denominado en el presente documento como un ciclo), seguido de una semana sin administraciones de células efectoras inmunitarias con CAR (por ejemplo, células T, células NK) y, a continuación, se administran al sujeto una o más administraciones adicionales de células efectoras inmunitarias con CAR (por ejemplo, células T, células NK) (por ejemplo, más de una administración de células efectoras inmunitarias con CAR (por ejemplo, células T, células NK) por semana). En otro caso, el sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) recibe más de un ciclo de células efectoras inmunitarias con CAR (por ejemplo, células T, células NK) y el tiempo entre cada ciclo es inferior a 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 o 3 días. En un caso, las células efectoras inmunitarias con CAR (por ejemplo, células T, células NK) se administran cada dos días durante 3 administraciones por semana. En un caso, las células efectoras inmunitarias con CAR (por ejemplo, células T, células NK) se administran durante al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más semanas.

[0391] En un aspecto, las células que expresan CAR de la presente divulgación se generan utilizando vectores virales lentivirales, tales como lentivirus. Las células, por ejemplo, CART, generadas de esa manera tendrán una expresión de CAR estable.

[0392] En un aspecto, las células que expresan CAR, por ejemplo, las CART, se generan utilizando un vector viral, tal como un vector gammaretroviral, por ejemplo, un vector gammaretroviral descrito en el presente documento. Las CART generadas utilizando estos vectores pueden tener una expresión de CAR estable.

[0393] En un aspecto, los CART expresan de manera transitoria vectores CAR durante 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 días después de la transducción. La expresión transitoria de los CAR se puede efectuar mediante la administración del vector CAR ARN. En un aspecto, el ARN CAR se transduce en la célula T mediante electroporación.

[0394] Un problema potencial que puede surgir en pacientes que reciben tratamiento con células efectoras inmunitarias CAR que expresan de forma transitoria (por ejemplo, células T, células NK) (particularmente con CART que contienen scFv murinos) es la anafilaxia después de múltiples tratamientos.

[0395] Sin limitarse a esta teoría, se cree que dicha respuesta anafiláctica podría ser causada por un paciente que desarrolla una respuesta humoral anti-CAR, es decir, anticuerpos anti-CAR que tienen un isotipo anti-IgE. Se cree que las células productoras de anticuerpos de un paciente experimentan un cambio de clase del isotipo IgG (que no causa anafilaxia) al isotipo IgE cuando hay una pausa de diez a catorce días en la exposición al antígeno.

[0396] Si un paciente tiene un alto riesgo de generar una respuesta de anticuerpos anti-CAR durante el transcurso de una terapia CAR transitoria (tal como los generados por transducciones de ARN), las pausas en la infusión de CART no deben durar más de diez a catorce días.

Procedimientos para la fabricación de células que expresan CAR

[0397] En otro aspecto, la divulgación se refiere a un procedimiento para fabricar una célula (por ejemplo, una célula efectora inmunitaria o población de la misma) que comprende introducir en (por ejemplo, transducir) una célula, por ejemplo, una célula T o una célula NK descrita en el presente documento, un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un CAR, por ejemplo, un CAR descrito en el presente documento; o un ácido nucleico que codifica una molécula de CAR, por ejemplo, un CAR descrito en el presente documento.

[0398] La célula en los procedimientos es una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, una célula T o una célula NK, o una combinación de las mismas). En algunos casos, la célula en los procedimientos es deficiente en diacilglicerol quinasa (DGK) y/o Ikaros.

[0399] En algunos casos, la introducción de la molécula de ácido nucleico que codifica un CAR comprende la transducción de un vector que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica un CAR, o la transfección de la molécula de ácido nucleico que codifica un CAR, en donde la molécula de ácido nucleico es un ARN transcrito in vitro.

[0400] En algunos casos, el procedimiento comprende además:

- a. proporcionar una población de células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T o células NK); y
- b. eliminar las células T reguladoras de la población, proporcionando así una población de células agotadas en células T reguladoras;

donde las etapas a) y b) se realizan antes de introducir el ácido nucleico que codifica el CAR en la población.

[0401] En los casos de los procedimientos, las células T reguladoras comprenden células T CD25+ y se eliminan de la población celular utilizando un anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo. El anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo, se puede conjugar con un sustrato, por ejemplo, una microesfera.

[0402] En otros casos, la población de células agotadas en células T reguladoras proporcionada a partir de la etapa (b) contiene menos del 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+.

[0403] En aún otros casos, el procedimiento comprende además la eliminación de células de la población que expresan un antígeno tumoral que no comprende CD25 para proporcionar una población de células agotadas en células T reguladoras y agotadas en moléculas inhibidoras antes de introducir el ácido nucleico que codifica un CAR en la población. El antígeno tumoral puede seleccionarse entre CD19, CD30, CD38, CD123, CD20, CD14 o CD11b, o una combinación de los mismos.

[0404] En otros casos, el procedimiento comprende además la eliminación de células de la población que expresan un inhibidor de puntos de control, para proporcionar una población de células agotadas en células T reguladoras y agotadas en moléculas inhibidoras antes de introducir el ácido nucleico que codifica un CAR en la población. El inhibidor de puntos de control puede elegirse entre PD-1, LAG-3, TIM3, B7-H1, CD160, P1H, 2B4, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), TIGIT, CTLA-4, BTLA y LAIR1.

[0405] Otros ejemplos divulgados en el presente documento abarcan la provisión de una población de células efectoras inmunitarias. La población de células efectoras inmunitarias proporcionada puede seleccionarse en función de la expresión de uno o más de CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA y/o CD45RO. En ciertas realizaciones, la población de células efectoras inmunitarias proporcionadas son CD3+ y/o CD28+.

[0406] En ciertos casos del procedimiento, el procedimiento comprende además expandir la población de células después de que se haya introducido la molécula de ácido nucleico que codifica un CAR.

[0407] En algunos casos, la población de células se expande durante un período de 8 días o menos.

[0408] En ciertos casos, la población de células se expande en cultivo durante 5 días, y las células resultantes son más potentes que las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo.

[0409] En otros casos, la población de células se expande en cultivo durante 5 días y muestra al menos un aumento de una, dos, tres o cuatro veces en las duplicaciones de células tras la estimulación con antígeno en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo.

[0410] En aún otros casos, la población de células se expande en cultivo durante 5 días y las células resultantes exhiben niveles más altos de IFN- γ y/o GM-CSF proinflamatorio, en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo.

[0411] En otros casos, la población de células se expande cultivando las células en presencia de un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3/TCR y/o un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de las células. El agente puede ser una microesfera conjugada con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento del mismo, y/o un anticuerpo anti-CD28, o un fragmento del mismo.

[0412] En otros casos, la población de células se expande en un medio apropiado que incluye una o más interleucinas que dan como resultado un aumento de al menos 200 veces, 250 veces, 300 veces o 350 veces en las células durante un período de expansión de 14 días, medido por citometría de flujo.

[0413] En otros casos, la población de células se expande en presencia de IL-15 y/o IL-7.

[0414] En ciertos casos, el procedimiento incluye además la crioconservación de la población de células después del período de expansión apropiado.

5 [0415] En aún otros casos, el procedimiento de preparación descrito en el presente documento comprende además poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con un ácido nucleico que codifica una subunidad de la telomerasa, por ejemplo, hTERT. El ácido nucleico que codifica la subunidad de la telomerasa puede ser ADN.

10 [0416] La presente divulgación también se refiere a un procedimiento para generar una población de células modificadas en ARN, por ejemplo, células descritas en el presente documento, por ejemplo, células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK), que expresan ARN exógeno de forma transitoria. El procedimiento comprende introducir un ARN transcrito *in vitro* o ARN sintético en una célula, donde el ARN comprende un ácido nucleico que codifica una molécula CAR descrita en el presente documento.

15 [0417] En otro aspecto, la divulgación se refiere a un procedimiento para proporcionar una inmunidad antitumoral en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una célula que comprende una molécula CAR, por ejemplo, una célula que expresa una molécula CAR descrita en el presente documento. En un caso, la célula es una célula T autóloga o una célula NK. En un caso, la célula es una célula T alogénica o una célula NK. En una realización, el sujeto es un ser humano.

20 [0418] En un aspecto, la divulgación incluye una población de células autólogas que se transfectan o transducen con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de CAR, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento. En un caso, el vector es un vector retroviral. En un caso, el vector es un vector lentiviral autoinactivador tal como se describe en otra parte del presente documento. En un caso, el vector se administra (por ejemplo, mediante transfección o electroporación) a una célula, por ejemplo, una célula T o una célula
25 NK, en donde el vector comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR de la presente divulgación tal como se describe en el presente documento, que se transcribe como una molécula de ARNm, y los CAR de la presente divulgación se traducen a partir de la molécula de ARN y se expresan en la superficie de la célula.

30 [0419] En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a una población de células que expresan CAR, por ejemplo, células efectoras inmunitarias que expresan CAR (por ejemplo, células T o células NK). En algunos casos, la población de células que expresan CAR comprende una mezcla de células que expresan diferentes CAR. Por ejemplo, en un caso, la población de células efectoras inmunitarias que expresan CAR (por ejemplo, células T o células NK) puede incluir una primera célula que expresa un CAR que tiene un dominio de unión a antígeno que se une a un primer antígeno tumoral tal como se describe en el presente documento, y una segunda célula que expresa un CAR que tiene
35 un dominio de unión a antígeno diferente que se une a un segundo antígeno tumoral tal como se describe en el presente documento. Como otro ejemplo, la población de células que expresan CAR puede incluir una primera célula que expresa un CAR que incluye un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno tumoral tal como se describe en el presente documento, y una segunda célula que expresa un CAR que incluye un dominio de unión a antígeno a una diana distinta de un antígeno tumoral tal como se describe en el presente documento. En un caso, la
40 población de células que expresan CAR incluye, por ejemplo, una primera célula que expresa un CAR que incluye un dominio de señalización intracelular primario, y una segunda célula que expresa un CAR que incluye un dominio de señalización secundario, por ejemplo, un dominio de señalización coestimulador.

45 [0420] En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a una población de células en la que al menos una célula de la población expresa un CAR que tiene un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno tumoral tal como se describe en el presente documento, y una segunda célula que expresa otro agente, por ejemplo, un agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR. Por ejemplo, en un caso, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora. Los ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, CEACAM (por
50 ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG-3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR beta. En un caso, el agente que inhibe una molécula inhibidora, por ejemplo, es una molécula descrita en el presente documento, por ejemplo, un agente que comprende un primer polipéptido, por ejemplo, una molécula inhibidora, asociada con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, por ejemplo, un dominio de
55 señalización intracelular descrito en el presente documento. En un caso, el agente comprende un primer polipéptido, por ejemplo, de una molécula inhibidora, tal como PD-1, LAG-3, CTLA-4, CD160, BTLA, LAIR1, TIM-3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), 2B4 y TIGIT, o un fragmento de cualquiera de los mismos, y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (por ejemplo, que comprende un dominio coestimulador (por ejemplo, 41BB, CD27 o CD28, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento) y/o un dominio de señalización primario (por ejemplo, un dominio de señalización CD3 zeta descrito en el presente documento). En un caso, el agente comprende un primer polipéptido de PD-1 o un fragmento
60 del mismo, y un segundo polipéptido de un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (por ejemplo, un dominio de señalización CD28, CD27, OX40 o 4-1BB descrito en el presente documento) y/o un dominio de señalización CD3 zeta descrito en el presente documento).

65 [0421] En un caso, la molécula de ácido nucleico que codifica un CAR de la presente divulgación, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, se expresa como una molécula de ARNm. En un caso, las células que expresan el CAR modificado genéticamente de la presente divulgación, por ejemplo, células efectoras inmunitarias

(por ejemplo, células T, células NK), se pueden generar transfectando o electroporando una molécula de ARN que codifica los CAR deseados (por ejemplo, sin una secuencia de vector) en la célula. En un caso, un CAR de la presente divulgación se traduce a partir de la molécula de ARN una vez que se incorpora y se expresa en la superficie de la célula recombinante.

[0422] Un procedimiento para generar ARNm para su uso en transfección implica la transcripción *in vitro* (IVT) de una plantilla con cebadores especialmente diseñados, seguida de la adición de poliA, para producir una construcción que contiene una secuencia no traducida ("UTR") 3' y 5' (por ejemplo, una UTR 3' y/o 5' descrita en el presente documento), un "cap" 5' (por ejemplo, un "cap" 5' descrita en el presente documento) y/o un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) (por ejemplo, un IRES descrito en el presente documento), el ácido nucleico que se va a expresar y una cola de poliA, típicamente de 50-2000 bases de longitud. El ARN así producido puede transfectar de manera eficiente diferentes tipos de células. En un caso, la plantilla incluye secuencias para el CAR. En un caso, un vector de ARN CAR se transduce en una célula, por ejemplo, una célula T o una célula NK, mediante electroporación.

[0423] Las secuencias de algunos ejemplos de varios componentes de CAR de la presente invención se enumeran en la Tabla 1, donde aa representa aminoácidos y na representa ácidos nucleicos que codifican el péptido correspondiente.

Tabla 1. Secuencias de varios componentes de CAR (aa - aminoácidos, na – ácidos nucleicos que codifica la proteína correspondiente)

SE Q ID NO:	Descripción	Secuencia	Correspondencia a huCD19
1	Promotor EF-1	CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATC GCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCCGCCAAT TGAACCGGTGCCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACTGGG AAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGGT GGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGT TCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTG CCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTTAT GGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTA CGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGG AGAGTTCGAGGCCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGT GCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCGCGG TGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTC GATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTTTGTATGACCTGCTGCG ACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAA GATCTGCACACTGGTATTTTGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGG CGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGGCGAGG CGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGG TAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGC GCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCC CGGTCCGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTC CCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCG CTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAA AGGGCCTTTCCGTCTCAGCCGTGCTTCATGTGACTCCAC GGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGA GCTTTTGGAGTACGTCTGCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTT TATGCGATGGAGTTTCCCCCACTGAGTGGGTGGAGACTGA AGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAAAT TGCCCTTTTGGAGTTTGGATCTTGCTTCATTCTCAAGCCTCA GACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTG A	100
2	Líder (aa)	MALPVTALLLPLALLHAARP	13
3	Líder (na)	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCT GCTGCTGCATGCCGCTAGACCC	54
4	Bisagra CD 8 (aa)	TTTPAPRPPTPPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CD	14
5	Bisagra CD 8 (na)	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCA CCATCGCGTCGCAGCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTG CCGGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCT GGACTTCGCCCTGTGAT	55

6	Bisagra (aa)	Ig4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGKM	102
7	Bisagra (na)	Ig4	GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCC CCGAGTTCTCGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAGG TGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCGCA GGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAC AACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCA CCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGA CTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAAGGTGTCCAACA AGGGCCTGCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGC CAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCC CCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC CTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACTACAAGA CCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTG TACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGG GCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCAC AACCCTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAA GATG	103
8	Bisagra (aa)	IgD	RWPESPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGE EKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLR DKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSN GSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREP AAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLE DQREVNTSGFAPARPPFPQGSTTFWAWSVLRVPAPSPQPAT YTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSIVTDH	47
9	Bisagra (na)	IgD	AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTTCC TACTGCACAGCCCCAGGCAGAAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTA CTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACTGGCCGTGGCGG GGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAAAGAACAGGAA GAGAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATACCCA GCCGCTGGGCGTCTATCTCTTGACTCCCGCAGTACAGGA TGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTTACATGTTTCGTCTGG GCTCTGACCTGAAGGATGCCCATTTGACTTGGGAGGTTGCC GGAAAGGTACCCACAGGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGG AGCGCCATTCCAATGGCTCTCAGAGCCAGCACTCAAGACTC ACCCTTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTCTGTCA ATGTAATCTAAATCATCCTAGCCTGCCCCACAGCGTCTGAT GGCCCTTAGAGAGCCAGCCGCCAGGCACCAAGTTAAGCTTA GCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTGATCCCCCAGAGGCCGCC AGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCCGGCTTTAGCCCGCCCAA CATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACA CCAGCGGCTTCGCTCCAGCCCGGCCCCACCCAGCCGGG TTCTACCACATTCTGGGCTGGAGTGTCTTAAGGGTCCCAG CACCACCTAGCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTG TCCCATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAG TCTGGAGGTTTCTACGTGACTGACCATT	48
10	Bisagra GS/enlazador (aa)		GGGSGGGGS	49
11	Bisagra GS/enlazador (aa)		GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC	50
12	CD8TM (aa)		IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	15
13	CD8TM (na)		ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCCT TCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGC	56
14	Dominio		KRGGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	16

	intracelular 4-1BB (aa)		
15	Dominio intracelular 4-1BB (na)	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCA TTTATGAGACCACTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGT AGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACT G	60
16	CD27 (aa)	QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPE PACSP	51
17	CD27 (na)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATACATGAA CATGACTCCCCGCCGCCGCCGCCACCGCAAGCATTAC CAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTC C	52
18	CD3-zeta (aa)	RVKFSRSADAPAYKQGQNLQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	17
19	CD3-zeta (na)	AGAGTGAAGTTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGGTACA AGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA CGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCG GGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCT CAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGC GGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGG AGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTA CAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGGCC CTGCCCCCTCGC	101
20	CD3-zeta (aa)	RVKFSRSADAPAYQGGQNLQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	43
21	CD3-zeta (na)	AGAGTGAAGTTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGGTACC AGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA CGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCG GGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCT CAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGC GGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGG AGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTA CAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGGCC CTGCCCCCTCGC	44
22	Enlazador	GGGGS	18
23	Enlazador	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC	50
24	Dominio extracelular PD-1 (aa)	pgwfdspdrpwnpptsfpallvtegdnatficsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaaf pedrsqpgqdcfrvtqipngdrfhmsvvrarnmdsgtylogaislapkaqikeslraelrvt erraevptahpspspragqfqtiv	
25	Dominio extracelular PD-1 (na)	cccgatgggttctggactctcgggacgcgcgtggaatccccaaactctcaccggcac tctgggtgtgactgagggcgataatgcgaccttcagtgctcgttctccaacacclccgaat cattcgtgctgaactggtacgcacatgagccgtcaaaccagaccgacaagctcgcgc gttccgggaagatcggctgcaacgggacaggattgtcgggtccgcgtgactcaactgcc gaatggcagagactccacatgagcgtggctcgcgttaggcgaaacgactccgggac ctacctgtcggagccatctcgtcggcctaaggcccaaatcaaagagagcttgagg gccgaactgagagtgaccgagcgcagagctgaggtgccactgcacatccatcccat cgctcggcctcggggcagtttcagacctggctc	
26	PD-1 (aa) CAR con señal	malpytalliplallhaarpwfdspdrpwnpptsfpallvtegdnatficsfsntsesfv lnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcfrvtqipngdrfhmsvvrarnmdsgtylog aislapkaqikeslraelrvterraevptahpspspragqfqtivttlpaprpptpaptiasq plslrpeacrpaagavhtrglfdacdiywaplgtcgvlisvitlyckrgrkkilyikqpfm rpvqttqeedgcscrfeeeeggcclrvkfsrsadapaykqgqnlqlynelnlgrreeydv dkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerngkghdglyqgi statkdtaldhmqalppr	

27	PD-1 (na)	CAR	atggcccccctgctacgcccgtctctcccccctgcactcctgctcccaagccgctagacc acctggatggtttctggactctccggatcgccctgggaatcccccaacctctcaacggca ctcttggttgactgaggggcgataatgogaccttcaagtgctctgttctccaacaactccga atcattcgtgctgaacctggatcgcgcatgagcccgtaaacacagacggacaagctgcg cgtttccggaagatcggtcgcaacccgggacaggattgtcgttccgcgtgacacacagc cgaatggcagagacttccacatgagcgtggtccgcgttaggcgaaacgactccggga cctaccctgctgagagccatctcgtctggcgctaaggcccaaatcaaaagagagctgagg gcgaactgagagtgaccgagcgcagagctgagggtgcaacctgcacatccatcccat cgctcggcctgcggggcagtttcagacccctggtaacgaccactccgggcgcgcgcgc accgactccggccccaactatcgcgagccagcccctgtcgtcgtgaggcgggaagcatgc cgccctgcgcgcggagggtgctgtgcataccggggatggacttgcgcatgcacatctac atttgggtcctctcgcgcgggaactgtgtggtgtctcctctgtcctcgtgtacacccctgactg caagcgggggtcggaaaaagcttctgtacattttcaagcagccctcatgaggcccgigca aaccacccaggaggaggacggttgcctcgcgggtcccggaagagggaagaaggag gttgcgagctgcgcgtgaagtctcccgagcgcgcgaacgcccgcctataagcaggg ccagaaccagctgtacaacgaactgaacclgggacggcggggaagagtagatgctgt ggacaagcgggcgcgcgcgggaccccgaaatgggcgggaagccclagaagaagaaa ccctcaggaaaggcctgtataacgagctgcagaaggacaagaatggccgagggcctactc cgaaatgggatgaaggggagagcggcgggagggggaaggggcacgacggccgtgac caaggactgtccacgcgcccaaggacacatacgaatgcctgtcacatgcaggcccttc cccctgc	
28	Enlazador	(Gly-Gly-Gly-Ser)n, donde n = 1-10	105	
29	Enlazador	(Gly4 Ser)4	106	
30	Enlazador	(Gly4 Ser)3	107	
31	Enlazador	(Gly3Ser)	108	
32	PD-1 (aa)	CAR	ggwfdspdrpwnpptfspallvteqdnatficsfntsesfvlwyrmspsnqtcklaaf pedrsqpggdcrfrvtglpngrdfhmsvvrarmdsqtlcgaislapkaqikeslrlnelvt erraeavptahospsspragcgttvtltpaprpptpaptiasqplsipeacrpaaggavht mldfacdiyiwaplagtgvllslvilyckgrkkllyifkqpfmrvqtlteedgcscrfee eeggcelrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgrrreydvlkngdrdpemggkprkn pgelynelqldkmaeayseigmkgerrmkghdglyqglstatktdyldalhmcalppr	
33	CD19 (aa) murino	CAR	MALPVTALLPLALLHAARPDIQMTQTSSLSASLSDRVTSISR ASQDISKYLNWYQKQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGG SGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSK SQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVT VSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYIWPAGTGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEEDGCSCRFPPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQG QNQLYNELNLRREEYDVLKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMCALPPR	

(continuación)

Antígeno de célula B	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
CD19	huscF v7	TCTVSGVSLPDYGVSWIRPPGKLEWGVWGGSETTYQSSLSKSRVTIS KDNSKNQVSLKLSVTAADTA VYCAKHYYGGSYAMDYWGQGLVTV SS	
CD19	huscF v8	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRPPGKLEWIG VIWGSETTYSSSLKSRVTISKNSKNQVSLKLSVTAADTA VYCAKHYY YGGSYAMDYWGQGLVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG QSPATLSLSPGERATLSRASQDISKYLNWYQKPGQAPRLLIYHTSRL HSGIPARFSGSGGTDYTLTISSLPQEDFAVYFCQQGNLTPYTFGQGTCL EIK	43
CD19	huscF v9	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRPPGKLEWIG VIWGSETTYQSSSLKSRVTISKNSKNQVSLKLSVTAADTA VYCAKHYY YGGSYAMDYWGQGLVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG QSPATLSLSPGERATLSRASQDISKYLNWYQKPGQAPRLLIYHTSRL HSGIPARFSGSGGTDYTLTISSLPQEDFAVYFCQQGNLTPYTFGQGTCL EIK	44
CD19	Hu scFv1 0	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSRASQDISKYLNWYQKPGQAPRLLIYH TSRLHSGIPARFSGSGGTDYTLTISSLPQEDFAVYFCQQGNLTPYTFGQ GTKLEIKGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG TCTVSGVSLPDYGVSWIRPPGKLEWGVWGGSETTYQSSLSKSRVTIS KDNSKNQVSLKLSVTAADTA VYCAKHYYGGSYAMDYWGQGLVTV SS	45
CD19	Hu scFv1 0	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRPPGKLEWIG VIWGSETTYNSSLKSRVTISKNSKNQVSLKLSVTAADTA VYCAKHYY YGGSYAMDYWGQGLVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG QSPATLSLSPGERATLSRASQDISKYLNWYQKPGQAPRLLIYHTSRL HSGIPARFSGSGGTDYTLTISSLPQEDFAVYFCQQGNLTPYTFGQGTCL EIK	46

000000

Antígeno de células B	Nombre	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
CD19	Hu scfv1 1	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYH TSRLHSGIPARFSGSGGTDTYLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQ GTKLEIKGGGGGGGGGSGGSGVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG VSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYNSSLKSRVTISKDNSK NQVSLKLSSVTAADTAIVYCAKHYYGGSYAMDYWGQGLVTVSS	47
CD19	Hu scfv1 2	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIG VIWGSETTYYNSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAIVYCAKH YYGGSYAMDYWGQGLVTVSSGGGGGGGGGGGSEIMTQSPAT LSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPA RFSGSGGTDTYLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIK	48
CD19	muCT L019	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYH TSRLHSGVPSRFSGSGGTDTYSLTISNLEQEDIAFYFCQQGNTLPYTFG GGTKLEITGGGGGGGGGGGSEVKLQESGPGLVAPSSLSVTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSSALKSRLLTIKDNSK SQVFLKMNSLQTDITAIYCAKHYYGGSYAMDYWGQGSVTVSS	49

[0424] Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, en lugar de limitar, la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Generación del vector pCINS

- 5 [0425] El vector de transferencia lentiviral parental pRRL.SIN.cPPT.EF1a.EGFP.WPRE fue sintetizado de novo por DNA2.0 utilizando secuencias derivadas de la estructura principal del vector pRRL.SIN elaborado por Dull et al. (J. Virol. 72: 8463-8471, 1998). Se presenta un mapa de características de pCINS en la **Figura 1**, mientras que en la **figura 2** se expone un mapa de restricción del vector.
- 10 [0426] Al generar el vector pCINS, se realizaron las siguientes modificaciones al vector parental:
1. Los elementos en cis 5' se reemplazaron por la secuencia natural correspondiente del aislado NL4-3 del VIH-1. Los elementos en cis 5' reemplazados incluyeron: señal de empaquetamiento (psi), secuencia de gag parcial adyacente a psi, elemento sensible a Rev (RRE) y la secuencia de env parcial que lo rodea, y una secuencia del tracto central de polipurina (cPPT) de pol.
 - 15 2. Los orígenes de replicación SV40 y f1 se eliminaron por ser redundantes para disminuir el tamaño del plásmido.
 3. Se introdujeron varios sitios de restricción entre los elementos en cis para facilitar la ingeniería del ADN.
 4. La secuencia inhibidora INS1 en gag, que restringe la exportación nuclear de ARN viral no empalmado (Revista de Virol. 71(7): 4892-4903, 1997; J. Virol. 66(12): 7176-7182, 1992), fue mutado, reduciendo así la restricción de la exportación nuclear del ARN o ARNs virales codificados por el vector.
 - 20 5. Parte de la secuencia de gag, después del nucleótido 168, que contiene las secuencias inhibidoras INS2, INS3 e INS4 (J. Virol. 68(6): 3784-3793, 1994), fue eliminada.
 6. El promotor de RSV fue reemplazado por un promotor de CMV, ya que tanto el promotor de RSV como el de CMV pueden usarse para la expresión de VL SIN (Science 272(5259): 263-267, 1996; J. Virol. 72(11): 8463-8471, 1998).
- 25 [0427] La secuencia de pCINS-EGFP se establece a continuación y se detalla en la Tabla 3. Las secuencias de EGFP se pueden reemplazar de manera opcional por secuencias de otro transgén (por ejemplo, un gen que codifica un CAR), si se desea, utilizando procedimientos estándar en la técnica.

Secuencia de pCINS-EGFP (SEQ ID NO: 50)

30 [0428]
 gcagactagtaagcttagtaaatcaattacgggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgtta
 cataacttaacgggtaaatggcccgccctggctgacccgcccaacgacccccgccattgacgtcaataatgac
 gtatgttcccatagtaacgcccaatagggaactttccattgacgtcaatgggtggagttatttacgggtaaact
 gcccaacttggcagttacatcaagtgtatcatatgccaaagtaacgccccctattgacgtcaatgacgggtaaat
 ggcccgccctggcatttatgccagttacatgaccttatgggactttccctacttggcagttacatctacgtatt
 agtcatcgctattaccatgctgatgcgggttttggcagttacatcaatgggcgtggatagcgggtttgactca
 cggggattttccaagttctccaccccaattgacgtcaatgggagtttggttttggcaccacaaatcaacgggaact
 ttccaaaatgtcgttaacaaactccgccccattgacgcacaaatgggcgggtaggcgtgtacgggtgggaggtcta
 tataagcagagctgggttagtgaacgggggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctg
 gctaactaggggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtggtgtgcccg

tctgttgtgtgactcttggttaactagagatccctcagaccctttttagtcagtggtggaaaatctctagcagt
 ggcgcgccgaacaggggaacttgaaaagcgaaaagtaaaagccagaggagatctctcgacgcaggaactcgggttgc
 tgaagcgcgcacgggaagaggcgagggcgggcgactgggtgagta.cgccaaaaattttgactagcggaggc
 tagaaggagagagatgggttgcgagagcggtcggtattaaagcgggggagaattagataaatgggaaaaaatt
 cggtaataaggccaggggggaagaagaagtaacaagctaaagccacatcgatatgggcaagcaggggagctaga
 acgattcgcagtttaactcctggccttttagagacatcagaaggcggccggtgatcttcagacctggaggag
 gcgatatgaggggacaatttgggagaagtgaattatataaatataaagtagtaaaaaattgaaccattaggagt
 agcaccacacaaaggcaaggagagagagtggttcagagagaaaaaagagcagtggggaatttlaaataaggagct
 ttgttcccttgggttcttgggagcagcaggaaagcactatgggcgcagcgtaaatgacgctgacgggtacagg
 ccagacaattattgtctgatatagtgcagcagcagaacaatttgcctgagggctattgaggcgcaacagca
 totgttgcaactcacagctctggggcatcaaacagctccaggcaagaatcctggctgtggaagataccta
 aaggatcacagctcctcctgcaggggaktttgggggttgcctctggaasactcatttgcaccactgctgtgc
 cttgggaatgctagttggagtaataaatctctggaacagatttgggaataacatgaacctggatggagtgagg
 cagagaaaatttaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaaccagcaagaag
 aatgaacaaagaattatttgggaattagataaatgggcaagtttctggaatttggtttaacataacaaatttggc
 tgttggtatataaaaattattcataatgatagtaggaggcttggtaggtttaagaatagtttttgcgtgact
 ttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccattatcgitttcagacccacctcccaatcccgagg
 ggaocccgacagggcccgaaagggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattag
 tgaacggatctcgacgggtatcgattagactgtagccaggaatatggcagctagattgtacacatttaga
 aggaaaagttatcttggtagcagttcatgtagccagtggtatetatagaagcagaagtaattccagcagag
 acagggcgaagaaacagcctacttctcttaaaaatttagcaggaagatggccagtaaaaacagctacatacag
 acaatggcagcaatttccacagtaactacagtttaaggccgcctgttgggtgggcggggatcaagcaggaatt
 tggcattccctacaaatccccaaagtcgaaggagtaatagaatctatgaataaagaattaaagaaaattata
 ggacaggtaaagagatcaggtcgaacatcttaagacagcagta.ccaaatggcagttattcatccacaatttta
 aaagaaaaggggggatttgggggttacagtgccaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacataca
 aactaaagaattacaaaaacaaattacaaaattcaaaaattttcgggtttattacagggacagcagagat
 ccagtttggctgcattgatcacgtgaggtcccggtgcgcgtcagtgggcagagcgcacatcgccacagt
 ccccgagaaagtgtggggggaggggtcggaattgaacoggtgcctagagaaggtggcgcggggttaaactgg
 gaaaagtgatgtcgtgtactggtcgcgcttttcccgaggggtgggggagaacogtatataaagtgcagtag
 tcgcggtgaacgttctttttcgcaacgggtttgcccgcagaaacacaggttaagtgcggtgtgtggttcccg
 cgggcttggcctcttttaagggtta.tggcctttgrytgco.tlgaattacttccacotggctgcagtagcgtg
 attccttgatcccgagcttcgggttggaaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccctt
 cgcctcgtgcttgagttgagggcctggcctggggcgctggggccgcgcgtgcgaatctggtggcacttcg
 cgcctgtctcgtgctttcgataagtctctagccatttfaaaattttgatgacctgctgcgacgcttttt
 ttctggcaagatagttcttgtaaatgogggccaaagatctgcacactgggtatttcgggtttttggggcgcggg
 ggggcgacggggcccggtgcgtccagcgcacatgttcgggcgaggcggggccttcgagcgcgggccaccgag
 aatcgggacgggggtagttctcaagctgggcggcctgctctggtgcctggcctcgcgcgcgcgtgtatcgcc
 ccgccttggggggcaaggctggcccggttcggccaccagttgcgtgagcggaaagatgggcgcttcccggc

ctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcgggtgagtcacccacacaaaag
 gaaaagggccttttcggtcctcagccgtcgttccatgtgactccactgagtagccggggcgccgtccaggcac
 ctcgattagttctcgagcttttggagtagctcgttcttttaggttggggggaggggttttctgcatggagt
 tccccacactgagtggggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttgggaatt
 tgccttttttgagtttggatcttggttcattctcaagccctcagacagtggttcaaaagttttttcttcca
 tttcagggtgtcgtgatctagaggatccgcaccatggtgagcaagggcgaggagctgttcaccgggggtgg
 tgcctatcctggtcgagctggcggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgaggg
 cgatgcacactaaggcaggctgacccctgaagttcactctgmaccaacgggcagctgcccgtgcccgtggccc
 accctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacg
 acctcttcaagtcocgcacatgcccgaaggctacgtccaggagcgccaccatcttcttcaaggacgaaggcaa
 ctacaagaccccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacacccctggtgaacgcacatcgagctgaaggcgatc
 gacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaaagctggagtagcaactacaacagccacaacgctctata
 tcatggccgacaaagcagaagaaoggcacaaaggtgaacttcaagatccgcacacaacatcgaggacggcgag
 cgtgcagctcgcggaccactaccagcagaacaccccccatcgggcgacggccccgtgctgctgcccgcacaac
 cactacctgagcaccacagtcocgcctgagcaaaagaccccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctgg
 agttcgtgacccgcgcggggatcactctggccatggagcagctgtacaagtaagtcgacaatcaacctct
 ggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatggttgccttttaacgctatgtggatac
 gctgctttaatgcctttgtatcatgctattgctcccgatggttccattttctcctccttctataaat
 cctgggtgctgtctctttatgaggagttgtggcccgltgtcaggcaacgctggcggtggtgtgactgtgtt
 tgcctgacgcaacccccactggttggggcattggcaccacctgtcagctcctttccgggacctttcgctttc
 cccctccctattggcacgggggaaactcatcgcgcgctgcttggcccggtgctggacaggggctcggtgt
 tgggcactgacaattcogtgggtgttgtcgggggaagctgagctcctttccatggctgctcgccgtgttgc
 caccctggattctgcgcgggacgtcctctctgctacgtcccttccggccctcaatccagcggaaccttccctcc
 cgcggcctgctgcccgtctctgcggcctcttccgcgctcttgccttccgcctcagacagctcggtatctcc
 tttgggcgcgcctccccgcctggaattogagctcggtacctttaagacaaatgacttacaaggcagctgta
 gatcttagccactttttaaaagaaaaggggggactggaagggctaattcactcccaacgaagacaagatc
 tgccttttgccttactggttctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggttaactagg
 gaacccactgcttaagcctcaetaaagcttgccttgagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgt
 gactctggttaactagagatccctcagaccccttttagtcagtggtgaaaactctctagcagtagtagttcat
 gtcatcttattattcagttatttataacttgcaaaagaaatgaatatcagagagtgagaggaacttggttat
 tgcagtttataalgggttacaataaagcaatagatcacaaatttacaataaagcattttttctactg
 cattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttcatcatgtctggtcttagctatcccgccct
 aggcacccggggaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgc
 tcatgagacaataacccctgataaangcttcaataaatattgaaaaaggaagagtatgagccatattcaacg
 ggaaacgtcgaggccgcgattcaattcaacatggatgctgaatttatatgggtataaatgggctcgcgat
 aatgtcgggcaatcaggtgcgacaatctatcgttgtatgggaagcccgatgcgcagagttgtttctga
 aacatgycaaaggttagcgttgcgaatgatgttacagatgagatggtcagactaaactggctgacgggaatt
 tatgcaccttccgaccatcaagcaattttatccgtactcctgatgatgcaggttaactcaacactgcgatac

cccggaacacagcgttccaggtattagaagaatatcctgattcaggtgaaaatattgttgatgcgctgg
cagtgttcctgcgcgggttgcaactcgattcctgttttgtaattgtccttttaacagcgatcgcgattttcg
cctcgctcaggcgcgaatcacgaatgaataacgggtttggttgatgcgagtgattttgatgacgagcgtaat
ggctggcctgttgaaacagctctggaaagaaatgcctaaacttttggcattcttcacccggattcagtcgtca
ctcatggtgattttctcacttgataacctatttttgacgaggggaaattaatagggttgattgatgttgg
acgagtcggaatcgacagccgataaccaggatcttggcattcctatggaaactgcctcggtgagttttctcct
tcattacagaaaacggctttttcaaaaaatatggtattgataatcctgatatgaataaattgcagtttcatt
tgatgctcgatgagttttctaaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatctaaaact
tcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgt
gagttttcgttcactgagcggtcagaccccgtagaaaagatcaaaaggatcttcttgagatccttttttc
tgcgcgtaatctgctgcttgcaacacaaaaaacaccgcctaccagcggtggtttgtttgccggatcaaga
gctaccaactcctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgccagataccaaatactgttcttctagt
tagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagccaccgctacatacctcgctctgctaatcctgt
taaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaaccgggttggaactcaagacgatatagttacggga
taaggcgccagcggtcggtctgaacggggggttcgtgcacacagccagccttggaagcgaacgacctaacc
gaactgagatacctacagcggtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaaagggaagggcggaacaggt
atccggtaagcggcagggctcggaacaggagagcgcaacgaggagccttcaggggggaaacgcctggtatct
ttatagtcctgtcggttttcgccacctctgacttgagcgctcgattttttgtgatgctcgctcagggggggcg
agcctatggaaaaacgcacgcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgcctggccttttgctcaca
tgctctttcctgcgttatccctgattctgttgataaccgctattarccgcttttgagtgagctgataccgc
tcgcccagccgaacgacccgagcgccagcgagtcagtgagcgagggaagcggaagagcgcccaataacgcaaa
ccgcctctcccgcgcggttgcccgattcattaatgcagctggcgcagacaggtttcccgactggaaagcgg
gcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccacaggttttacactttatgct
tcgggtcgtatgttgtgtggaattgtgagcggtataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgat
tacgccaagcgcgcaattaacctcactaaagggaacaaaaagctggagct

Ejemplo 2. Generación del vector pNOX

- 5 [0429] El vector pCINS generado en el Ejemplo 1 se modificó adicionalmente para producir el vector pNOX. En particular, el elemento regulador postranscripcional (PRE) del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) presente en pCINS se reemplazó por un PRE del virus de la hepatitis B (HPRE), que incluye la secuencia natural del aislado bba6 del virus de la hepatitis B, genoma completo (GenBank: KP341007.1). WPRE estaba presente en el vector parental para asegurar la expresión eficiente del transgén. Sin embargo, WPRE contiene una secuencia codificante de proteína
- 10 X. La presencia del ORF de proteína X en WPRE puede plantear problemas de seguridad para la integración de vectores lentivirales. Por ejemplo, la proteína X se ha visto implicada en la generación de cánceres de hígado (Gen Ther. 12(1):3-4, 2005). En el vector pNOX, se introdujo una mutación puntual en el codón de inicio (ATG->AGG) de la proteína X. Como resultado, el HPRE recombinante no contiene ningún ORF de la proteína X. En la **figura 13** se presenta un mapa de características de pNOX, mientras que en la **figura 14** se expone un mapa de restricción del
- 15 vector.

[0430] La secuencia de pNOX-EGFP se establece a continuación y se detalla en la Tabla 4. Las secuencias de EGFP se pueden reemplazar de manera opcional por secuencias de otro transgén (por ejemplo, un gen que codifica un CAR), si se desea, utilizando procedimientos estándar en la técnica.

20

Secuencia de pNOX-EGFP (SEQ ID NO: 51)

gcagactagtaagcttagtaatacaattacgggggtcatttagttcatagcccatatatggagttccgcgtta
cataacttacggttaaatggcccgctgtggtgacgcccccaacgacccccgcccatatgacgtcaataatgac
gtatgttcccatagtaacgcccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacgggtaaact
gcccaacttggcagtaacatcaagtgtatcataatgcccaagtacgcccccatattgacgtcaatgacgggtaaat
ggccgcgctggcattatgcccaagtacatgacattatgggaactttcctacttggcagtaacatctacgtatt
agtcacatcgctattaccatgctgatgcgggttttggcagtaacatcaatgggcgtggatagcgggtttgactca
cggggatttcccaagctctccaccccattgacgtcaatgggaggtttgttttggcaccacaaatcaacgggact
ttccaaaatgttgttaacaaactccgccccattgacgcacaaatgggcgggtaggcgtgtacggtgggaggtcta
tataagcagagctgggttttagtgaacccgggggtctctctgtgttagaacagatctgagcctgggagctctctg
gtaactaggggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttaagtagtgtgtgcccg
tctgtttgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtggaaaatctctagcagt
ggcgcgccgaacagggacttgaagagcgaaagtaaaagccagaggagatctctcgacgcaggactcggcttgc
tgaagcgcgcacggcgaagaggcgaggggcggcgactgggtgagtaacgccccaaatattgactagcggagggc
tagaaggagagagagatgggtgtcgagagcgtcgggtattaaagcgggggagaaatagataaatgggaaaaaat
cggtaataaggccaggggggaaggaagagtaacaagctaaagcacatcgtatgggcgaagcaggagagctaga
acgatttcgcagttaatcctggccttttagagacatcagaaggcggccgctgatcttcagaccctggaggag
gcgatattgagggacaattgggagaagtgaattatataaataataaagtagtaaaaattgaaccattaggagat
agcaccacccaaaggcaagagagagagtggtgcagagagagaaaaagagcagtggggaatttaaataggagct
ttgttcccttgggttcttgggagcagcagggaagcactatgggcgcagcgtcaatgacgctgacgggtacagg
ccagacaattattgtctgatattagtgccagcagcagaacaatttgcctgagggctattgaggcgcaacagca
tctgttgcactcaacagctctggggcatcaaacagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagataccta
aaggatcaacagctcctcctgcaggggatttgggggttgcctctggaaaaactcatttgcaccactgctgtgc
cttggaaatgctagtctggagtaataaatctctggaaacagatttgggaataacatgacctggatggagtgagg
cagagaaattaaacattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaaag
aatgaacaagaattatttgaattagataaatgggcaagtttgttggaattgggtttaacatacaaaattggc
tgtgttatataaaattattcataatgatagtaggagggttggtaggtttaagaattagtttttgcgtgact
ttctatagtgaaatagagtttaggcagggtattcaccattatcggttcagacccacctcccaatcccgagg
ggacccgacaggcccgaaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattag
tgaacggatctcgacgggtatcgattgacctgtagccagggaatatggcagctagattghacacatttaga
aggaaaaagtattcttggtagcagttcattgttagccagtggtatatatagaagcagaagtaattccagcagag
acagggcaagaaacagcatacttccctcttaaaattagcaggaagatggccagtaaaaacagtaacatacag
acaatggcagcaatttcaccagtaactacagtttaaggccgcgctgttgggtgggcgggggatcaagcaggaatt
tggcattccctacaatcccccagtcaggagtaataagaattctatgaataaagaattaaagaaaattata

ggacaggtsagagatcaggctgaacatcttaagacagcagtcacaaatggcagttatccatccacaatttta
 aaagaaaaggggggattgggggtacagtgcaggggaagaatagtagacataatagcaacagacataca
 aactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaaattttogggtttattacagggacagcagagat
 ccagitttggtgcattgatcacgtgaggtccgggtgccgtcagtgaggcagagccacatcgcccaagtc
 ccccgagaagttgggggggaggggtcggcaattgaaccgggtgcctagagaaaggtggcgcggggtaaactgg
 gaaaagtgatgtcgtgtactgggtccgctttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgacagtag
 tcgcgtgaacgttcttttttcgcaacgggtttgccgcacagaacacaggttaagtgcctgtgtgtggttcccg
 ogggcctggcctctttacgggttatggccttgggtgccttgaattacttccacctggctgcagtaacgtg
 attcttgatcccgagcttcgggttggaaagtgggtgggagagttcgaggccttggccttaaggagccctt
 cgcctcgtgcttgagttgaggtcctggcctggggcgtcggggccgcgcgcgtgcgaatctggtggcaccttcg
 cgcctgtctcgtgctttcgataagtctctagccattttaaatttttgatgacctgctgogacgcttttt
 ttctggcaagatagttcttgtaaatgcggggccaagatctgcacactgggtatttcgggttttttggggccgcgg
 ggggcgaacggggcccggtgcgttcacagcgcacatgttcgggcagggcggggcctgcgagcgcggccaacggag
 aatcggaacgggggtagttctcaagctggccggcctgctctgggtgcctggcctgcgcgcgcgtgtatcgcc
 ccgccttggggcggaaggctggcccggtcggcaccagttgcgtgagcggaaaagatggccgcttcccgcc
 ctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcggggagagcggggcggtgagtcacccacacaaag
 gaaaagggccttttcggtcctcagcgcgtcgtttcatgtgactccactgagtaacggggcgccgtccaggcac
 ctcgattagttctcgagcttttggagtaacgtcgtctttaggttggggggaggggttttatcgatggaagt
 ttcccccactgagttgggtgggagactgaagttaggccaggttggcacttgatgtaattctccttggaaatt
 tgccctttttgagtttggatcttgggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagtttttttcttcca
 tttcaggtgtcgtgatctagacgatccgcaccatggtgagcaaggggcgaggagctgttcaccgggggtgg
 tgcccatcctgggtcgagctggaacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgaggg
 cgatgcacactacggcaagctgaacctgaagtttcattctgcacacccggcaagctgcccgtgcccggccc
 accctcgtgaccacccctgacctacggcggtgcagtgcttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacg
 acttcttcaagtccgcaatgcgcgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgaacggcaa
 ctacaagaccgcgcgcgggtgaagttcgaggggcgaacacccgtggtgaacccgcatcgagctgaaggccatc
 gacttcaaggaggagcggcaacatctcggggcacaagctggagtaacaactacaacagccacaacgtctata
 tcatggccgacaagcagaagaaoggcctcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcag
 cgtgcagctcggcgacacacacagcagaacaccccatcgggcagcggcccggtgctgctgcgcgacaac
 cactacctgagcaccagtcgcgcctgagcaaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctgg
 agttcgtgacggcgccggggtacactctcggcatggacgagctgtacaagtaagtcgactaaacaggcct
 attgattggaaaagtatgtcaacgaattgtgggtcttttgggggttgctgccccttttacgcaatgtggat
 atcctgctttaatgcctttatatgcatgtatacaagcaaaacaggcctttactttctcgccaacttacaa
 ggccctttctaagtaaacagttatctgaccctttaccccggttgctcggcaacggcctggtctgtgccagtg
 tttgctgacgcaaccccccactgggtggggcttggccataggccactcagcgcatgctggaacctttgtgt
 ctctctgcgcgatccatactgcggaactcctagccgcttgttttgcctgcagcaggtctggagcgaacat
 catcgggactgacaattctgtcgtgctctcccgcaagttatcatcgtttccagggtgctaggtgtgtgt
 gccaaactggatccctgcgcgggagcgtcctttgtttacgtcccgtcggcgctgaattccgcgggacgaacccct

ccggggccgcttggggctctaccgcccgttctccgtctgccgtaccgaccgaccggggcgccctc
 totttacggggactccccgtctgtgcctttctcatctgcccggaccgtgtgcacttcgcttcaactctgcac
 gtccgatggagaccacogtgaacgcccaccggaacctgcccaaggtcttgcataagaggactcttggaact
 ttcagcaatgtcaacgaattcgagctcggtaccttcaagaccaatgaacttacaaggcagctgtagatctt
 agccacttttttaaaagaaaaggggggactgggaagggctaaattcactccaaacgaagacaagatctgcttt
 ttgcttgaactgggtctctctgttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaccc
 actgcttaagcctcaataaagcttgcttgagtgcttcaagtagtggtgcccgtctgtttgtgtgactct
 gglaactagagatccctcagaccccttttaglccagltgtggaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatc
 ttattattcagttatttataacttgcaaaagaaatgaatatcagagagtgagaggaacttggtttattgcagc
 ttataatgggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcaactgcattct
 agttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggctctagctatcccgcccttaggcac
 cgggggaaatgtgtgcgggaacccctatttgtttattttctaaatacattcaaatatgtatcorgctcatga
 gacaataacccctgataaattgcttcaataatattgaaaaagggaagagtatgagccatattcaacgggaac
 gtccagggcccgagattaaattccaacatggatgctgatttatctgggtataaatgggctcccgataaattgc
 gggcaatcaggtgcgacaatctatcgcttgttatgggaagcccgatgcgccagagttgtttctgaaacatg
 gcaaaaggtagcgtttgcaaatgatgttacagatgagatgggtcagaactaaactggctgaaggaaatttatgcc
 acttccgaccatcaagcattttatccgtactcctgatgatgcattgggtactcaccactgcgatccccgga
 aaaaacagcgttccaggtattagaagaatatcctgattcaggtgaaaaatattgttgatgcctggcagtggt
 tctgtgcgggttgccactcgattcctgtttgttaattgtcccttttaacagcgatccgctatttccgctcgc
 tcaggcccaatcacgaatgaataacgggtttgggttgatgcgagtgattttgatgacgagcgttaattggctgg
 cctgttgaaacagttctggaaagaaatgcataaacttttgcactctccaccggattcagtcgtcaactcatg
 gtgattttctcacttgataaccttatttttgacgagggggaattaatagggtgtattgatgttgggaagagt
 cgggaatgcgagaccgataccaggatcttgccatcctatggaaactgcctcgggtgagttttctccttcatba
 cagaaacgggtttttcaaaaatatgggtattgataatcctgatatgaataaattgcagtttcatttgatgc
 tcgatgagtttttttaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatitt
 ttaatttaaaaggatctagggtgaagatcctttttgataatctcatgaccasaatcccttaacgtgagttt
 tccgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaaggatcttcttgagatccttttttctgcggc
 taatctgctgcttgcaaacacaaaaaccacgcctaccagcgggtgggtttgtttgcccgatcaagagotacc
 aactctttttcgaaggtaactggcttcagcagagcgcagatacacaataactgttctcttagtgtagccg
 tagttaggccaccacttcaagaactcgttagcaccgcctacatacctcgcctctgctaactcctgttaccag
 tggctgctgacagtggcgataaagtcgtgttcttaccgggttggacacaaagacatagttaccggataaggc
 gcagcggctcgggctgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttggaagcgaacgacctacaccgaactg
 agatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccgg
 taagcggcaggggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaacgcctggtatctttatag
 tctgtcgggttttcgccactctgacttgagcgtcgattttttgtgatgctcgtcaggggggaggagccta
 tggaaaaaacggcagcaacgcggcctttttacgggttcctggcctttttgctggccttttgcacatgtttct
 ttctgtcgttatccctgattctgtggataaccgctattaccgcctttgagtgagctgataacgcctcgcgg
 cagccgaaacgacggagcgcagcaggtcagtgagcggaggaagcgggaagagcgcccaatacgcacaaacgcct

```
ctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcaccgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtg
agcgcaacgcgaattaatgtgagtttagctcactcattagggcaccgccagggtttacactttatgcttcggc
tcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacgcc
aagcgcgcgaattaacctcactaaagggsacaaaaagctggagct
```

Ejemplo 3. Títulos virales generados utilizando los vectores pCINS y pNOX

- 5 [0431] Para determinar la eficacia de los vectores de transferencia lentivirales pCINS y pNOX, se realizó una serie de experimentos, en los que uno de los vectores de transferencia se introdujo en células mediante transfección transitoria de células de empaquetamiento. De manera resumida, las células Expi293™ (ThermoFischer) se cultivaron en 5 ml de medio Freestyle (FS) a una concentración de 5 mln/ml a 200 rpm, 37 °C y 8 % de CO₂, 80 % de humedad. La transfección se realizó utilizando el reactivo de transferencia PEIPro (PolyPlus) utilizando 3 µg de pNVS-MDLgp-RRE,
- 10 3 µg de pNVS RSV Rev-Kan, 0,75 µg de pNVS-MDG-VSVG-Kan y 6 µg de vector de transferencia (pCINS o pNOX). Los sobrenadantes virales se recogieron 48 horas después de la transfección y se sometieron a análisis de título (es decir, medición del título infeccioso).
- 15 [0432] En las células 293T, el vector de transferencia del plásmido pCINS generó un título viral aproximadamente cinco veces mayor que el generado por el vector parental (**Figura 5A**). El título se evaluó en función del porcentaje de células positivas a GFP. Esta producción viral inesperadamente fuerte puede deberse a mayores cantidades de ARN genómico lentiviral generado por la transcripción mediada por el promotor del CMV en las células de empaquetamiento (medido por qRT-PCR) y una exportación más eficiente del ARN del LV no empalmado desde el núcleo debido a la ausencia de retención nuclear.
- 20 [0433] El vector de transferencia pNOX fue capaz de generar títulos de vector similares o más altos en comparación con pCINS (**Figura 5B - 5D**). Los títulos infecciosos se midieron por la expresión de GFP en células 293T, células T Jurkat y células T humanas primarias transducidas. En particular, pNOX generó niveles similares de expresión de GFP a pCINS en células 293T (**Figura 5B**) y en células T humanas primarias (**Figura 5D**), pero en realidad produjeron
- 25 cantidades sustancialmente mayores de células Jurkat que expresaban GFP en relación con pCINS (**Figura 5C**).
- [0434] También se examinó el nivel de expresión del transgén después de la integración genómica de elementos de un vector de transferencia lentiviral. Las células T se infectaron con virus producidos utilizando los vectores de transferencia pNOX o pCINS, de modo que los elementos virales se integraron en los genomas de las células T. El
- 30 vector lentiviral que contenía HPRE, pNOX, dio como resultado niveles similares de expresión del transgén en comparación con el vector lentiviral que contenía WPRE, pCINS (**Figura 5 E**). Estos resultados fueron sorprendentes en base a informes previos de que WPRE (en pCINS) es más potente que HPRE (ver, por ejemplo, J. Virol. 72: 5085-5092, 1998; Gene Therapy 14, 1298-1304, 2007).
- 35 [0435] La presente invención incluye el vector pCINS, así como vectores relacionados que incluyen partes del vector pCINS y/o secuencias que comparten identidad (por ejemplo, al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con pCINS) con una o más secuencias de pCINS. Las secuencias que pueden incluirse en dichos vectores relacionados incluyen todas las secuencias de pCINS, o subconjuntos que incluyen, por ejemplo, varias combinaciones del promotor viral (es decir, el promotor que impulsa la expresión de las proteínas virales), gag parcial (por ejemplo,
- 40 que carece de INS2, 3 y 4, y/o que incluye una mutación INS1 tal como se describe en el presente documento), env parcial, RRE, cPPT, promotor subgenómico (por ejemplo, promotor EF1alfa, que incluye de manera opcional sitios donantes de empalme constitutivos y sitios aceptores de empalme constitutivos, tal como se describe en el presente documento) y PRE (de manera opcional con una mutación inactivadora de proteína X, tal como se describe en el presente documento) (estas secuencias tienen cada una de manera opcional las identidades de secuencia indicadas
- 45 anteriormente). Dichos vectores pueden incluir un transgén (por ejemplo, un gen que codifica un CAR o EGFP, tal como se describe en el presente documento).

Tabla 3. Características de pCINS

Característica	Secuencia de ácido nucleico	SEQ ID NO:
----------------	-----------------------------	------------

Promotor de CVM	GTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATA TATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATG GCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCC ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC GCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGG AGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACAT CAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGA CGTCAATGACGGTAAATGGCCGCGCTGGCATTATG CCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGG CAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATG CTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGG ATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCC ACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCAC CAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAA CTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGT GTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTT AGTGAACCG	52
R	GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGG AGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAG CCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTC	53
U5	AAGTAGTGTGTGCCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGT AACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTG GAAAATCTCTAGCAG	54
PBS	TGGCGCCCGAACAGGGAC	55
Señal de empaquetamiento	TTGAAAGCGAAAAGTAAAGCCAGAGGAGATCTCTCG ACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCA AGAGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCA AAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGA TGGGTGCGAGAGCGTCGGTATTA	56
SD	ACTGGTGAGT (<i>indicado mediante el subrayado dentro de la secuencia de señal de empaquetamiento anterior</i>)	57
Secuencia de gag parcial (de NL4-3) con la señal de INS mutada	ATGGGTGCGAGAGCGTCGGTATTAAGCGGGGGAG AATTAGATAAATGGGAAAAAATTCGGTAATAAGGC CAGGGGGGAAAGAAGAAGTACAAGCTAAAGCACAT CGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTGCA GTAAATCCTGGCCTTTTAGAGACATCAGAAG	58
Sitio de restricción <i>NotI</i>	GCGGCCGC	59
Secuencia de env parcial	TGATCTTCAGACCTGGAGGAGGCGATATGAGGGA CAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGT AAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGG CAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGC AGTGGGA	60
Sitio de restricción <i>SwaI</i>	ATTTAAAT	61
RRE	AGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAG GAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGAC GGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGATATAGTGC AGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGC GCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCA TCAAACAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAA AGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCT	62
Sitio de restricción <i>SbfI</i>	CCTGCAGG	63

Secuencia de env parcial que contiene el aceptor de empalme SA7	GGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACTCATTTGCACC ACTGCTGTGCCTTGGGAATGCTAGTTGGAGTAATAA ATCTCTGGAACAGATTTGGAATAACATGACCTGGA TGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGC TTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAG CAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGAT AAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACA AATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATA GTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGC TGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGAT <u>ATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAATC</u> CCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAG AAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCAT TCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGT	64
SA7	AGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGAC	65
Sitio de restricción <i>ClaI</i>	ATCGAT	66
cPPT	TAGACTGTAGCCAGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAAAGT TATCTTGGTAGCAGTTTCATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTAATTCCA GCAGAGACAGGGCAAGAAACAGCATACTTCTCTTTAAATTAGCAGGAAGATGGC CAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGGCAGCAATTTTACCAGTACTACAGTTAA GGCCGCCCTGTTGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCCTACAAATCCC CAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGAATAAAGAATTAAAGAAAATTATAGGAC AGGTAAGAGATCAGGCTGAACATUTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCTAT CCACAATTTTAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGATA GTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAA AAATTCAAAATTTTGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGCT	67
SA1	GTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGG (indicado en subrayado en la secuencia cppt anterior)	68
Sitio de restricción <i>PstI</i> con extremos romos	CTGCAT	69
Sitio de restricción <i>BclI</i>	TGATCA	70
Promotor EF1alfa	CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGACAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGA GAAGTTGGGGGAGGGGTCCGCAATTGAACCGGTGCCCTAGAGAAGGTGGCGCGGG GTAAACTGGGAAAGTGATGTCTGTACTGGCTCCGCCCTTTTCCCGAGGGTGGGG GAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTT TSCCGCCAGAACACAGGTAAGTSCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTT ACGGCTTATGGCCCTTGCGTGGCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCACTACGTGA TTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCCAGGGCCTTGGCG TTAAGGAGCCCCCTTCGCCCTCGTGTGCTTGAGTTGAGGCTGGGCTGGGCGCTGGGGC CGCGCGGTGCGAATCTGGTGGCACCCTTCGCCCTGTCTCGCTGCTTTTCTGATAAGT CTCTAGCCATTTAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGA TAGTCTTGTAAATGCGGGCCAGATCTGCACACTGGTATTTTCCGTTTTTGGGGCC GGGGGCGGCGACGGGGCCCGTGGGTCCAGCGCACATGTTCCGGCAGAGCGGGGGCC TGCGAGSCCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGGCTGC TCTGGTGCCCTGGCCCTCGCGCCCGCCGTGTATCGCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTG GCCCGGTCCGCACCASTTGGTGAGCGGAAAGATGGCAGCTTCCCGGCCCTGCTG CAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGGCCTCGGACAGCGGGCGGGTGAGTCAAC CACACAAAGGAAAAGGGCCCTTTCCGTCCTCAGCCCTCGCTTCATGTGACTCCACT GAGTACCGGGCGCGCTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGT CGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATCGGATCGAGTTTCCCCACACTGAGTG CGTGGAGACTGAAGTTAGGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTT GCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCAATCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAA GTTTTTTTTCTTCCATTTTCAAGTGTCTGTA	71
Donante de empalme constitutivo (CD)	CAGAACACAGGTAAGTGCCG (indicado mediante subrayado en la secuencia de P-EF1a anterior)	72

Aceptor de empalme constitutivo (CD)	TCCATTTTCAGGTGTCGTGA (indicado mediante subrayado en la secuencia de P-EF1a anterior)	73
Sitio de restricción <i>XbaI</i>	TCTAGA	74
Sitio de restricción <i>BamHI</i>	GGA TCC	75
EGFP	ATGGTGAGCAAGGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGG TGGTGCCCATCCTGGTCCGAGCTGGACGGCGACGT AAACGGCCACAAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGC GAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGA AGTTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCC CTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGC GTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGAACCACATGA AGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAA GGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGA CGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAG TTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGC TGAAGGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACAT CCTGGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGC CACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAAGAA CGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACA TCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTA CCAGCAGAACACCCCCCATCGGCCGACGGCCCCGTG CTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGT CCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAAGCGCGA TCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC GGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGT AA	76
Sitio de restricción <i>Sall</i>	GTCGAC	77
WPRES	ATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACCTATGT TGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATT GCTTCCCGTATGGCTTTCAATTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTC TTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTGAGGCAACGTCGGCTGGTGTGCACTGTGTT TGCTGACGCAACCCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACTGTGAGCTCCTTTCC GGGACTTTCCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACCTCATCGCCGCCCTGCC TTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGT GTGCGGGGAAGCTGACGTCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATT CTGCGCGGGACGTCTTCTGTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTC CTTCCCCCGGCTGTGTGCGGGCTCTGCGGGCTCTTCCGCGCTCTTCCGCTTCCGCC TCAGACGAGTCCGATCTCCCTTTGGGCCGCTCCCGGCTG	78
Sitio de restricción <i>EcoRI</i>	GAATTC	80
Sitio de restricción <i>SacI</i>	GAGCTC	81
Sitio de restricción <i>KpnI</i>	GGTACC	82
Secuencia de Nef parcial, que contiene PPT	CTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGAT CTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGG	83
dU3	ACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGACAAG ATCTGCTTTTTGCTTGTACT	84
R	GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGG AGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAG CCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTC	85
U5	AAGTAGTGTTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGT AACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTAGTCAGTGTG GAAAATCTCTAGCAG	86

poliA de SV40	AACTTGTGTTTATTGTCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATT TCACAAATAAAGCAATTTTTCTACTGCAATCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCAT CAATGTATCTTATCATGTC	87
nptII	ATGAGCCATATTCACCGGGAAACSTCGAGBECGCGATTAAATTCCAACATGGATG CTGATTTATATGCGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTGCGGCAATCAGGTGCGAC AATCTATCGCTTGTATGCGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGC AAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGA CGGAATTTATGCCACTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTAICTCCTGATGATGC ATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGAAAAACAGCGTTCCAGGTATTAGAAGAA TATCCTGATTCAGGTGAAATATTTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGT TGGACTCGATTCCTGTTTGTAAATGTCTCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTCCGCT CGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGT GACGAGCGTAATGGCTGGCTGTGGAACAAGTCTGGAAGAAATGCATAAACTTT TGCCATTTCTCACCAGGATTCAGTCTGCTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCT TATTTTTCAGCAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATC GCAGACCGATACCGAGGATCTTGCCATCCTATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCTC CTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAA TAAATTGCAGTTTCAATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAA	88
pUC ori	AGATCAAAGGATCTTCTTTGAGATCTTTTTTTCTCGCGGTAATCTGCTGCTTGCA AACAAAAAACCACCGCTACCGAGCGGTGGTTTGTTCGCCGATCAAGAGCTACCA ACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTCTGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGTT TTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCAGCTAC ATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTGG TGTTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACUGGATAAGGCGCAGCGGTGG GCTGAACGGGGGTTGCTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGA ACTGASATACCTACAGCGTGAAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGA AAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGCCAGGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGG AGCTTCCAGGGGGAAACGCTGCTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCCGCCACT CTGACTTGAGCGTGCATTTTGTGATGCTGCTCAGGGGGGGGAGCCTATGGAAA AACGCCAGCAACCGG	89

[0436] La presente invención incluye el vector pNOX, así como vectores relacionados que incluyen partes del vector pNOX y/o secuencias que comparten identidad (por ejemplo, al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con pNOX) con una o más secuencias de pNOX. Las secuencias que pueden incluirse en dichos vectores relacionados incluyen todas las secuencias pNOX, o subconjuntos que incluyen, por ejemplo, varias combinaciones del promotor viral (es decir, el promotor que impulsa la expresión de las proteínas virales), gag parcial (por ejemplo, que carece de INS2, 3 y 4, y/o que incluye una mutación INS1 tal como se describe en el presente documento), env parcial, RRE, cPPT, promotor subgenómico (por ejemplo, promotor EF1alfa, que de manera opcional incluye sitios donantes de empalme constitutivos y sitios aceptores de empalme constitutivos, tal como se describe en el presente documento) y PRE (de manera opcional, con una mutación inactivadora de proteína X, tal como se describe en el presente documento) (estas secuencias tienen cada una de manera opcional las identidades de secuencia indicadas anteriormente). Dichos vectores pueden incluir un transgén (por ejemplo, un gen que codifica un CAR o EGFP, tal como se describe en el presente documento).

Tabla 4. Características de pNOX

Característica	Secuencia de ácido nucleico	SEQ ID NO:
Promotor de CVM	GTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATG GCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCC ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC GCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGG AGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACAT CAAGTGATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGA CGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATG CCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGG CAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATG CTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGG ATAGCGGTTTGAATCACGGGGATTTCGAAGTCTCC	52

	ACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCAC CAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAA CTCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGT GTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTT AGTGAACCG	
R	GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGG AGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAG CCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTC	53
U5	AAGTAGTGTGTGCCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGT AACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTG GAAAATCTCTAGCAG	54
PBS	TGGCGCCCGAACAGGGAC	55
Señal de empaquetamiento	TTGAAAGCGAAAGTAAAGCCAGAGGAGATCTCTCG ACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCA AGAGGCGAGGGGCGGCG ACTGGTGAGT ACGCCA AAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGA TGGGTGCGAGAGCGTCGGTATTA	56
SD	ACTGGTGAGT (<i>indicado mediante el subrayado dentro de la secuencia de señal de empaquetamiento anterior</i>)	57
Secuencia de gag parcial (de NL4-3) con la señal de INS mutada	ATGGGTGCGAGAGCGTCGGTATTAAGCGGGGGAG AATTAGATAAATGGGAAAAAATTCGGTAATAAGGC CAGGGGGAAAGAAGAAGTACAAGCTAAAGCACAT CGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGA GTTAATCCTGGCCTTTTAGAGACATCAGAAG	58
Sitio de restricción <i>NotI</i>	GCGGCCGC	59
Secuencia de env parcial	TGATCTTCAGACCTGGAGGAGGCGATATGAGGGA CAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGT AAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGG CAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGC AGTGGGA	60
Sitio de restricción <i>SwaI</i>	ATTTAAAT	61
RRE	AGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAG GAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGAC GGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGATATAGTGC AGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGGCTATTGAGGC GCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCA TCAAACAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAA AGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCT	62
Sitio de restricción <i>SbfI</i>	CCTGCAGG	63
Secuencia de env parcial que contiene el aceptor de empalme SA7	GGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACTCATTTGCACC ACTGCTGTGCCTTGAATGCTAGTTGGAGTAATAA ATCTCTGGAACAGATTTGGAATAACATGACCTGGA TGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGC TTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAG CAAGAAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGAT AAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACA AATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATA GTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGC <u>TGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGAT</u> <u>ATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAATC</u> CCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAG AAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCAT TCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGT	64
SA7	AGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGAC	65
Sitio de restricción <i>Clal</i>	ATCGAT	66

cPPT	TAGACTGTAGCCCAAGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAAAAGT TATCTTGGTAGCAGTTTCATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTAATTCCA GCAGAGACAGGGCAAGAAACAGCATACTTCCTCTTAAATTTAGCAGGAAGATGGC CAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGGCAGCAATTTCAACAGTACTACAGTTAA GGCCGCCCTGTTGGTGGGGGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCTTACAAATCCC CAAAGTCAGGAGTAATAGAATUTATGAATAAAGAATTAAAGAAAATTATAGGAC AGGTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCAT CCACAATTTTAAAGAAAAGGGGGGATTTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAAAT GTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAA AAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGCT	67
SA1	GTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGG (indicado en subrayado en la secuencia cppt anterior)	68
Sitio de restricción <i>Pst</i> I con extremos romos	CTGCAT	69
Sitio de restricción <i>Bcl</i> I	TGATCA	70
Promotor EF1alfa	CGTGAGGGCTCCGGTGCCCGTTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCAGA GAACTTGGGGCCAGGGGTCCGGCAATTTGAACCGGTGCCCTAGAGAAGGTGGCGCGGG GTAAACTGGGAAAGTGATGTGCTGTACTGGCTCCGCCCTTTTTCCCGAGGGTGGGG GAGAADCCTATATAAGTGCAGTAGTCCGCCGTGAACGTTCCTTTTCGCAACGGGTT TCCCGCCAGAACACAGGTAAAGTGCCTGTGTGTGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTT ACGGGTATGGCCCTTGGCTGCCCTTGAATTAATTCACCTGGCTGCAGTACGTGA TTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAAGTGGGTGGGAGAGTTCCAGGCCCTTCCGC TTAAGGAGCCCCCTTCGCCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCCTGGCCTGGGCGCTGGGGC CGCCCGCTGCGAATCTGGTGGCACCCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGT CTCTAGCCATTTAAAAATTTTGTATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGA TAGTCTTTGTAAATGCGGGCCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCC GCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGGCGAGGCGGGGGCC TGCGAGCGCGGCCACCGAGATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGC TCTGGTGCCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGATGCGCCCGCCTGGGCGGCAAGGCTG GCCCCGTCCGCCACCASTTGCCTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTG CAGCGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCCCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAATCACC CACACAAAGGAAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCCTCGCTTCATGTGACTCCACT GAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGT CGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG GGTGGAGACTGAAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAAATTT GCCCTTTTGAAGTTTGGATCTTGGTTCAFTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAA GTTTTTTTCTTCCATTCAGGTGTCTGTA	71
Donante de empalme constitutivo (CD)	CAGAACACAGGTAAGTGCCG (indicado mediante subrayado en la secuencia de P-EF1a anterior)	72
Aceptor de empalme constitutivo (CD)	TCCATTTCAGGTGTCGTGA (indicado mediante subrayado en la secuencia de P- EF1a anterior)	73
Sitio de restricción <i>Xba</i> I	TCTAGA	74
Sitio de restricción <i>Bam</i> HI	GGA TCC	75

EGFP	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGG TGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGT AAACGGCCACAAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGC GAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGA AGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCC CTGGCCACCCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGC GTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGA AGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAA GGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGA CGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAG TTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGC TGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACAT CCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGC CACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAAGAA CGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACA TCGAGGACGGCAGCGTGACGCTCGCCGACCACTA CCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTG CTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGT CCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGA TCACATGGTCCTGCTGGAGTTCTGTGACCGCCGCC GGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGT AA	76
Sitio de restricción <i>Sall</i>	GTCGAC	77
HPRE Nox	TAAACAGGCCCTATTGATTGGAAAGTATGTCAACGAATTGTGGGTCTTTTGGGGTT TGCTGCCCCCTTTACGCAATGTGGATATCCTGCTTTAATGCCCTTATATGCATGT ATACAAGCAAAACAGGCTTTTACTTTCTCGCCAACTTACAAGGCCTTTCTAAGTA AACAGTATCTGACCCCTTACCCCGTTGCTCGGCAACGGCCTGGTCTGTGCCAAGT GTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCTTGGCCATAGGCCATCAGCGCATG CGTGGAAACCTTTGTGTCTCCTCTGCGGATCCATACTGCGGAACCTCCTAGCCGCTT GTTTTGCTCGCAGCAGGCTCTGGAGCGAAACTCATCGGGACTGACAATTCTGTCTGT GCTCTCCCCCAAGTATACATCCTTTCCAGGGCTCTAGGCTGTGCTGCCAAGTGG ATCCTGCGCGGGGACGTCCTTTGTGTTACGTCCTCGTGGGCGCTGAATCCCGCGGACG ACCCCTCCCCGGSSCGGCTTGGSSGCTCTACCGCCGCTCTCTCGCTGCGCGTACCG ACCGACCAAGGGGGCGACCTCTCTTTACGCGGACTCCCCGTCTGTGCTTCTCAT CTGCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCAGCTCGCATGGAGACCACCGT GAACGCCCCACCGAACCCTGCCCAAGGTCTTGCATAAGAGGACTCTTGGACTTTCA GCAATGTCAAC (el codón subrayado es el codón ATG/AGG mutado del ORF de la proteína X)	79
Sitio de restricción <i>EcoRI</i>	GAATTC	80
Sitio de restricción <i>SacI</i>	GAGCTC	81
Sitio de restricción <i>KpnI</i>	GGTACC	82
Secuencia de Nef parcial, que contiene PPT	CTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGAT CTTAGCCACTTTTTAAAGAAAAGGGGGG	83
dU3	ACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGACAAG ATCTGCTTTTGTCTTGTACT	84
R	GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGG AGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAG CCTCAATAAAGCTTGCCCTTGAGTGCTTC	85
U5	AAGTAGTGTGTGCCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGT AACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTG GAAAATCTCTAGCAG	86
poliA de SV40	AACTTGTTTATTCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATT TCACAAATAAAGCAATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCAT CAATGTATCTTATCATGTC	87
nptII		88

	ATGAGCCATATTCAACGGGAAACSTCEAGGGCCGCEATTAATAATTCACACATGGATG CTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTGGGCAATCAGGTGCGAC AATCTATCGCTTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGASTTGTCTTGAAACATGGC AAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGA CGGAATTTATGCCACTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGC ATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGAAAAACAGCGTTCCAGGTATTAGAAGAA TATCCTGATTCAGGTGAAATATTTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGT TGCACCTCGATTCTGTGTTTGTAAATGTCTCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTCCCT CGCTCAGGCGCAATCAGCAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCEAGTGATTTTGAT GACGAGCGTAATGGCTGCGCTGTGTAACAAGTCTGCAAGAAATGCATAAACTTT TGCCATTTCTCACCAGGATTCAGTCTGTCACCTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCT TATTTTGTACGAGCGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATC GCAGACCGGATAACAGGATCTTGCCATCCTATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCTC CTTCATTACAGAAACGGCTTTTTTCAAAATATCGTATTCATAATCCTGATATGAA TAAATTCAGTTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAA	
pUC ori	AGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGGTAAATCTGCTGCTTGCA AACAAAAAACCACCGCTACCAAGCGGTGGTTTGTGCGCGATCAAGAGCTACCA ACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGTT TTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTAC ATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTG TGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGG GCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCCACTTGGAGCGAAGCAGCTACACCGA ACTGAGATACTTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGA AAGCGCGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGCTCGGAACAGGAGAGCGCAGCGGG AGCTTCCAGGGGGAACCGCTGCTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCCGCCACT CTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGGCGAGCCTATGGAAA AACGCCAGCAACGCG	89

Ejemplo 4. Generación del vector de transferencia pNLV

[0437] El vector pNOX generado en el Ejemplo 2 se modificó adicionalmente para producir el vector pNLV. Los mapas de características y restricciones de pNLV se muestran en las **Figuras** 13 y 14, respectivamente. El elemento cPPT de pNOX se reemplazó por la secuencia cPPT que se muestra en la SEQ ID NO: 92. cPPT representa la posición de la secuencia de pol 2698-2850 (ver SEQ ID NOs: 92 y 93). Se incluye una secuencia de Kozak inmediatamente en dirección 5' del gen que codifica el transgén (por ejemplo, EGFP, tal como se muestra en la **Tabla 5**). Por último, se utilizó un promotor EF1a de tipo salvaje (P-EF1a) de SEQ ID NO: 95. El vector pNLV tiene un título viral aumentado y un perfil de bioseguridad mejorado.

[0438] La secuencia del vector pNLV y las secuencias de los elementos en el vector pNLV se muestran a continuación. En algunos casos, la estructura principal del vector y los elementos incluidos en el vector pNLV, y partes de la misma, se pueden utilizar en cualquiera de los vectores descritos en el presente documento. Las secuencias de la estructura principal del vector y los elementos funcionales se pueden insertar en otro vector y/o reemplazar partes de otro vector de acuerdo con procedimientos de clonación bien conocidos en la técnica.

[0439] La secuencia pNLV-EGFP se establece a continuación y se detalla en la Tabla 5. Las secuencias de EGFP se pueden reemplazar de manera opcional por secuencias de otro transgén (por ejemplo, un gen que codifica un CAR), si se desea, utilizando procedimientos estándar en la técnica.

Secuencia de pNLV-EGFP (SEQ ID NO: 90)

GTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAA
 ATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCA
 TAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTT
 GGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC
 GCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTTGGCAGTACATCTACGTATTAGT
 CATCGCTATTACCATGCTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCA
 CGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTGGCACCAAAATCAACGGG
 ACTTTTCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGG
 AGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGG
 GAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCCTCAAG
 TAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTAGTCAGTGTG
 GAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGTAAAGCCAGAGGAGATCTCT
 CGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGSCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTA
 CGCCAAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTGGGTATTAAGC
 GGGGAGAAATTAGATAAATGGGAAAAATTCGGTAATAAGGCCAGGGGGAAGAAGAAGTACAAGC
 TAAAGCACATCGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTGCGAGTTAATCCTGGCCTTTAGAGAC
 ATCAGAAGGCGGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGCGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAA
 TTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAAGAGAAGAGT
 GGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATTTAAATAGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCA
 GCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGAT
 ATAGTGCAGCAGCAGAACAAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGDATCTGTTGCAACTCACAG
 TCTGGGGCATCAAAACAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCT
 CCTCCTGCAGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTATTGACCACTGCTGTGCCTTGGGAATGCT
 AGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATAACATGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAA
 TTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAAATGAA
 CAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACAAATTGGCTGTG
 GTATATAAAATTATTACATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGTGTACTTTC
 TATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTAATCGTTTCAGACCCACCTCCCAATCCCGAGG
 GGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTGCG
 ATTAGTGAACCGATCTCGACGGTATCGATACTAGTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAG
 AAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACA
 AACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGA
 TCCACTTTGGCTGCATTGATCACGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCC
 ACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCCGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGG
 GGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTA
 TATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGGCGCCAGAACACAGGTAAGT
 GCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGGCTGCCTTGAATTACT
 TCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCCG
 AGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGG
 CCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATT

TAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGA
TCTGCACACTGGTATTTGGGTTTTTGGGGCCCGGGGCGGCGACGGGGCCCGTGGGTCCAGCGCA
CATGTTCCGGCGAGGCGGGGCCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGC
TGGCCGGCCTGCTCTGGTGGCTGGCCTCGCGCCCGCGTGTATCGCCCCCGCCCTGGGCGGCAAGG
CTGGCCCCGGTGGGACACAGTTGGGTGAGCGGAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAG
CTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGG
CCTTCCGTCTCAGCCGTGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCG
ATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTCTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTT
TCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTTCTCTTGGAA
TTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTTCTTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTT
CCATTTCAAGGTGTGCTGATCTAGAGGATCCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACC
GGGGTGGTGCCCATCTGGTGCAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAAGCTGTCCGG
CGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTTCATCTGCACCACCGGCAAGC
TGCCCGTGGCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTGCAAGTCTCAGCCGCTACC
CCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTAAGTCCAGGAGCGCA
CCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTGAGAGGGGACACCC
TGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAG
CTGGAGTACAACATAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGCGGCATCAAG
GTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGAGCTCGCCGACCACTACCAGCAG
AACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGC
CCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCTGTACCGCCCGCG
GGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGTCGACTAAACAGGCCTATTGATTGGAAAGTA
TGTC AACGAATTGTGGGTCTTTGGGGTTTGTGCCCCCTTTACGCAATGTGGATATCTGCTTTAAT
GCCTTTATATGCATGTATACAAGCAAAACAGGCTTTTACTTTCTCGCCAACCTTACAAGGCCCTTTCTAA
GTAAACAGTATCTGACCCTTTACCCCGTTGCTCGGCAACGGCCCTGGTCTGTGCCAAGTGTGTGCTGA
CGCAACCCCCACTGGTTGGGGCTTGGCCATAGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGTCTCC
TCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCCTAGCCGCTTGTGTTGCTCGCAGCAGGTCTGGAGCGAAACTC
ATCGGGACTGACAATTCTGTGCTGCTCTCCCGCAAGTATACATCGTTTCCAGGGCTGCTAGGCTGTG
CTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCTTTGTTTACGTCCCGTCCGGCGCTGAATCCCGCGGACG
ACCCCTCCCGGGGCGCTTGGGGCTTACCGCCCGCTTCTCCGTCTGCCGTACCGACCGACACG
GGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACTCCCGCTGTGCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTC
GCTTCACCTCTGCACGTGCGATGGAGACCACCGTGAACGCCACCGGAACCTGCCAAGGTCTTGC
ATAAGAGGACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGAATTCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACT
TACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACT
CCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTG
GGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAA
GTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTAGTCAGTGT
GGAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTGCTATTATTATTCAGTATTTATACTTGCAAAGAAATGAA
TATCAGAGAGTGAGAGGAACCTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACA
AATTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTGTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTT
ATCATGTCTGGCTCTAGCTATCCCGCCCTAGGCACCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTT
TATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTATAAATGCTTCAATAATA
TTGAAAAGGAAGAGTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCGAGGCCGCGATTAAATCCAACATG
GATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTGCGGCAATCAGGTGCGACAATCTATC
GCTTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATG
ATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCACTTCCGACCATCAAGCA
TTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCGGAAAAACAGCGTTCCAG
GTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGT
TGCACTCGATTCTGTTTGTAAATTGCTTTTTAACAGCGATCGCGTATTTGCTCTGCTCAGGCGCAA
TCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTG
AACAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTTGCCATTCTCACCAGATTGAGTGTGCACTCATGGTGAT
TTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGG
AATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTAC

AGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGC
 TCGATGAGTTTTTCTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACCTTCATTT
 TTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTT
 TTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGC
 GCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCAGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAAGA
 GCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGTTCTTCTAG
 TGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACTCGCTCTGCTAAT
 CCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTGGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATA
 GTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGC
 GAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAG
 GGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCT
 TCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTGA
 TTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACCGCGGCCTTTTTACGG
 TTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAA
 CCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGT
 CAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATT
 CATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAAT
 GTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTG
 GAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAAT
 TAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTGCAGACTAGTAAGCTTA

[0440] Los elementos funcionales presentes en el vector pNLV se muestran en la **Tabla 4** a continuación. Partes de la secuencia completa de pNLV pueden incluir secuencias de la estructura principal del vector. Dichas secuencias de la estructura principal del vector pueden usarse como secuencias de la estructura principal del vector o partes de las mismas, o reemplazarlas, en cualquiera de los vectores descritos en el presente documento (por ejemplo, pCINS, pNOX y pNLV).

[0441] La presente invención incluye el vector pNLV, así como vectores relacionados que incluyen partes del vector pNLV y/o secuencias que comparten identidad (por ejemplo, al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con pNLV) con una o más secuencias de pNLV. Las secuencias que pueden incluirse en dichos vectores relacionados incluyen todas las secuencias de pNLV o subconjuntos que incluyen, por ejemplo, varias combinaciones del promotor viral (es decir, el promotor que impulsa la expresión de las proteínas virales), gag parcial (por ejemplo, que carece de INS2, 3 y 4, y/o que incluye una mutación de INS1 tal como se describe en el presente documento), env parcial, RRE, cPPT, promotor subgenómico (por ejemplo, promotor EF1alfa, que de manera opcional incluye sitios donantes de empalme y sitios aceptores de empalme constitutivos tal como se describe en el presente documento) y PRE (de manera opcional con una mutación inactivadora de la proteína X, tal como se describe en el presente documento) (estas secuencias tienen cada una de manera opcional las identidades de secuencia indicadas anteriormente). Dichos vectores pueden incluir un transgén (por ejemplo, un gen que codifica un CAR o EGFP, tal como se describe en el presente documento).

Tabla 5. Características de pNLV

Característica	Secuencia de ácido nucleico	Fuente	SEQ ID NO:
Promotor de CVM/potenciador, P-CMV	GTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATA TATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATG GCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCC ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC GCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGG AGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACAT CAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGA CGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATG CCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGG CAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATG CTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGG ATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCC	GenBank: KT186368.1	52

	ACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCAC CAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAA CTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGT GTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTT AGTGAACCG		
R	GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGG AGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAG CCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTC	Aislado NL4-3 del VIH-1 GenBank: AF324493.1	53
U5	AAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGT AACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTAGTCAGTGTG GAAAATCTCTAGCAG	Aislado NL4-3 del VIH-1 GenBank: AF324493.1	54
PBS	TGGCGCCCGAACAGGGAC	Aislado NL4-3 del VIH-1 GenBank: AF324493.1	55
Señal de empaquetamiento, psi	TTGAAAGCGAAAGTAAAGCCAGAGGAGATCTCTCG ACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCA AGAGGCGAGGGGCGGCGCACTGGTGAGTACGCCA AAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGA TGGGTGCGAGAGCGTCCGGTATTA	Aislado NL4-3 del VIH-1 GenBank: AF324493.1	56
Donante de empalme principal, SD	<u>ACTGGTGAGT</u> (indicado mediante el subrayado dentro de la secuencia de señal de empaquetamiento anterior)		57
Secuencia de gag parcial (de NL4-3) con la señal de INS mutada	ATGGGTGCGAGAGCGTCCGGTATTAAGCGGGGGAG AATTAGATAAATGGGAAAAAATTCGGTAATAAGGC CAGGGGGAAAGAAGAAGTACAAGCTAAAGCACAT CGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGA GTTAATCCTGGCCTTTTAGAGACATCAGAAG	Secuencia modificada de aislado NL4-3 del VIH-1 GenBank: AF324493.1	58
Sitio de restricción <i>NotI</i>	GCGGCCGC		59
Secuencia de env parcial	TGATCTTCAGACCTGGAGGAGGCGATATGAGGGA CAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGT AAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGG CAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGC AGTGGGA	Aislado NL4-3 del VIH-1 GenBank: AF324493.1	60
Sitio de restricción <i>SwaI</i>	ATTTAAAT		61
RRE	AGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAG GAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGAC GGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGATATAGTGC AGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGC GCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCA TCAAACAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAA AGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCT	Aislado NL4-3 del VIH-1 GenBank: AF324493.1	62
Sitio de restricción <i>SbfI</i>	CCTGCAGG		63
Secuencia de env parcial que contiene el aceptor de empalme SA7	GGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTATTTGCACC ACTGCTGTGCCTTGGGAATGCTAGTTGGAGTAATAA ATCTCTGGAACAGATTTGGAATAACATGACCTGGA TGGAGTGGGACAGAGAAAATTAACAATTACACAAGC TTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAG CAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGAT AAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACA AATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATA GTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGC TGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGAT	Aislado NL4-3 del VIH-1 GenBank: AF324493.1	64

	<u>ATTACCAATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAATC</u> CCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAG AAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCAT TCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGT		
SA7	<u>AGTTAGGCAGGGATATTACCAATTATCGTTTCAGAC</u> (indicado mediante el subrayado dentro de la secuencia de env anterior)		65
Sitio de restricción <i>Clal</i>	ATCGAT		66
Sitio de restricción <i>SpeI</i>	ACTAGT		91
Secuencia de pol parcial que contiene cPPT y aceptor de empalme SA1	AGTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAG AAAAGGGGGGATTGGGGGGGTACAGTGCAGGGGAA AGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACT AAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAATTT TTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCACT TTGG [de manera alternativa: ACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAA AGGGGGGGATTGGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAAG AATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAA AGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAATTTT CGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCACTTT GG]	Aislado SF3 del VIH-1 GenBank: KJ704796.192	92
		[Aislado NL4-3 del VIH-1 GenBank: AF324493.1]	93
SA1	<u>GTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCACTTTGG</u> (indicado mediante subrayado en la secuencia cPPT anterior)	Aislado NL4-3 del VIH-1 GenBank: AF324493.1	94
Sitio de restricción <i>PstI</i> con extremos romos	CTGCAT		69
Sitio de restricción <i>BclI</i>	TGATCA		70
Promotor EF1alfa	CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGC GCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGG AGGGGTCCGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGG TGCGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGT ACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGA ACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTT TTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCGAGAACACAGGT AAGTGGCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTC TTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTAC TTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCG AGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAG GCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTT GAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCC GCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCT CGCTGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTT TTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAG ATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACT GGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACG GGGCCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAG GCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGG ACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTG GTGCCTGGCCTCGCGCCGCGGTGTATCGCCCCGC CCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCCAG TTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCC	GenBank: HQ644134.1	95

	TGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGC TCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAA GGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCA TGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGC ACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCTG TCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGA GTTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTA GGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAA TTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTC AAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCA TTTCAGGTGTCGTGA		
Donante de empalme constitutivo (CD)	CAGAACACAGGTAAGTGCCG (indicado mediante subrayado en la secuencia de P-EF1a anterior)		72
Aceptor de empalme constitutivo (CD)	TCCATTTCAAGGTGTCGTGA (indicado mediante subrayado en la secuencia de P-EF1a anterior)		73
Sitio de restricción <i>XbaI</i>	TCTAGA		74
Sitio de restricción <i>BamHI</i>	GGA TCC		75
Secuencia Kozak	GCCACC	PMCID: PMC306349	96
EGFP	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCAACCGGGG TGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGT AAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGC GAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGA AGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCC CTGGCCCAACCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGC GTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGA AGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAA GGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGA CGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAG TTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGC TGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACAT CCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGC CACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAA CGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACA TCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTA CCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTG CTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGT CCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGA TCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC GGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGT AA	GenBank: KJ697753.1	76
Sitio de restricción <i>Sall</i>	GTCGAC		77
HPRE modificado NoX	TAAACAGGCCTATTGATTGGAAAGTATGTCAACGA ATTGTGGGTCTTTTGGGGTTTGCTGCCCTTTTAC GCAATGTGGATATCCTGCTTTAATGCCCTTTATATGC ATGTATACAAGCAAAACAGGCCTTTTACTTTCTCGCC AACTTACAAGGCCTTTCTAAGTAAACAGTATCTGAC CCTTTACCCCGTTGCTCGGCAACGGCCTGGTCTGT GCCAAGTGTGCTGACGCAACCCCACTGGTTG GGGCTTGGCCATAGGCCATCAGCGCATGCGTGGA ACCTTTGTGTCTCCTCTGCCGATCCATACTGCGGA ACTCCTAGCCGCTTGTTTTGCTCGCAGCAGGTCTG	Aislado bba6 del virus de la hepatitis B, GenBank: KP341007.1	79

	GAGCGAAACTCATCGGGACTGACAATTCTGTCGTG CTCTCCCGCAAGTATACATCGTTTCCAGGGCTGCT AGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACG TCCTTTGTTTAGGTCCCGTCGGCGCTGAATCCCGC GGACGACCCCTCCCGGGGCGCGCTTGGGGCTCTAC CGCCCGCTTCTCCGTCTGCCGTACCGACCGACCA CGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACTCCCGTC TGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCG CTTCACCTCTGCACGTCGCATGGAGACCACCGTGA ACGCCCACCGGAACCTGCCCAAGGTCTTGATAA GAGGACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAAC (el codón subrayado es el codón ATG/AGG mutado de la proteína X)		
Sitio de restricción <i>EcoRI</i>	GAATTC		80
Sitio de restricción <i>SacI</i>	GAGCTC		81
Sitio de restricción <i>KpnI</i>	GGTACC		82
Secuencia de Nef parcial, que contiene PPT	CTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGAT CTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGG	Aislado NL4-3 del VIH-1 GenBank: AF324493.1	83
dU3	ACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGACAAG ATCTGCTTTTTGCTTGTACT	Aislado NL4-3 del VIH-1 GenBank: AF324493.1	84
R	GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGG AGCTCTCTGGCTAACTAGGGAAACCCACTGCTTAAG CCTCAATAAAGCTTGCCCTTGAGTGCTTC	Aislado NL4-3 del VIH-1 GenBank: AF324493.1	85
U5	AAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGT AACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTAGTCAGTGTG GAAAATCTCTAGCAG	Aislado NL4-3 del VIH-1 GenBank: AF324493.1	86
Señal de terminación y poliadenilación de SV40	TAGTAGTTCATGTCATCTTATTATTCAGTATTTATAA CTTGCAAAGAAATGAATATCAGAGAGTGAGAGGAA CTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAG CAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTT TTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCAT CAATGTATCTTATCATGTCTGGCTCTAGCTATCCCG CC	GenBank: KX757255.1	97
Kan-R	ATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCGAGGCCGC GATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGT ATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGT GCGACAATCTATCGCTTGTATGGGAAGCCCGATGC GCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCG TTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTA AACTGGCTGACGGAATTTATGCCACTTCCGACCAT CAAGCATTTTATCCGTAATCCTGATGATGCATGGTT ACTCACCAGTGCATCCCGGAAAAACAGCGTTCC AGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATA TTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCTGCGCCGGTTG CACTCGATTCTGTTTGTAAATTGTCTTTTAACAGC GATCGCGTATTTGCGCTCGCTCAGGCGCAATCACG AATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTG ATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTC	Sintetizado por DNA2.0	88

	TGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACCG GATTCAGTCGTCACCTCATGGTGATTTCTCACTTGAT AACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGT ATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATA CCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACCTGCGGTG AGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTTCAA AATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGC AGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAA		
--	---	--	--

Ejemplo 5. Optimización de vectores de transferencia para la producción lentiviral

[0442] Se desarrolló un sistema de vectores de transferencia lentivirales mejorado con mayores títulos virales, características de bioseguridad mejoradas, eficiencia de transducción mejorada y expresión transgénica duradera. Se rediseñaron varios elementos en *cis* para generar una estructura principal de vector de transferencia pNLV (**Figura 6**). Para determinar la eficacia del vector de transferencia lentiviral pNLV que codifica GFP en comparación con el vector de transferencia pCINS que codifica GFP, se realizó una serie de experimentos, en los que uno de los vectores de transferencia se introdujo en células mediante transfección transitoria de células de empaquetamiento. De manera resumida, las células Expi293™ (Thermo Fisher) se cultivaron en 5 ml de medio Freestyle (FS) a una concentración de 5 ml/ml a 200 rpm, 37 °C y 8 % de CO₂, 80 % de humedad. Las transfecciones se realizaron utilizando el reactivo de transferencia PEIPro (PolyPlus) utilizando 3 µg de pNVS-MDLg-RRE, 3 µg de pNVS 20 RSV Rev- Kan, 0,75 µg de pNVS-MDG-VSVG-Kan y 6 µg de plásmido de transferencia. Los sobrenadantes virales se recogieron 48 horas después de la transfección y se sometieron a análisis de título (es decir, medición del título infeccioso).

[0443] El vector de transferencia pNLV generó un título viral aproximadamente dos a tres veces mayor que el generado por el vector parental de control (es decir, antes de la optimización) (**Figura 7 A**). El título físico se evaluó en función del número de copias de ARN viral (por ejemplo, medido por qRT-PCR), y el título infeccioso se determinó en función de las unidades infecciosas determinadas por el ensayo de título de integración proviral (**Figura 7 B**).

[0444] A continuación, se examinó el nivel de expresión transgénica después de la integración genómica de elementos del vector pNLV en comparación con el vector de transferencia pCINS. Las células T se infectaron con virus producidos utilizando los vectores lentivirales pCINS o pNLV, de modo que los elementos virales se integraron en los genomas de las células T. Se descubrió que el vector pNLV tenía un mayor nivel de expresión transgénica (medido por FACS) en comparación con pCINS (**Figuras 8A-8C**).

[0445] Los vectores pNLV y pCINS también se compararon con varios vectores de transferencia comerciales con respecto a su título infeccioso relativo. Cada uno de los vectores comerciales y el vector pCINS se compararon por separado con un vector de control (parental) que codifica GFP, y el vector pCINS se comparó además con pNLV. El vector de transferencia pLVX (Clontech) se transdujo en células 293T y se encontró que tenía un título viral ligeramente más alto que el vector de control (**Figura 9A**). El vector de transferencia pLenti6.2 (Life Technologies) se transdujo en células y se encontró que tenía una gran disminución en el título viral en comparación con el vector de control (**Figura 9B**). El vector de transferencia pD2109 (DNA2.0) se transdujo en células y se encontró que tenía una pequeña disminución en el título viral en comparación con el vector de control (**Figura 9C**). El vector de transferencia pCINS se transdujo en células y se encontró que tenía un título viral sustancialmente más alto que el vector de control (**Figura 9D**). El vector de transferencia pNLV también se transdujo en células y se encontró que tenía un título viral más alto que el vector pCINS (**Figura 9E**). Estos resultados indican que los virus creados utilizando tanto pCINS como pNLV son, en general, significativamente más infecciosos que aquellos creados utilizando vectores de transferencia lentivirales disponibles comercialmente, y que los virus creados utilizando el vector pNLV exhiben el título viral más alto.

[0446] Para investigar los efectos del empalme en el título infeccioso, se mutaron una serie de sitios donantes y aceptores de empalme para la posterior determinación del título viral (**Figura 10A**). Los diversos mutantes del sitio donador y aceptor de empalme del vector de transferencia pCINS se transfectaron en células de empaquetamiento y se comparó el título viral en el panel de mutantes con un vector de transferencia de control (**Figura 10B**). Todas las mutaciones provocaron una gran disminución del título viral, lo que indica que la presencia de sitios de empalme en la estructura principal del vector de transferencia es necesaria para obtener el título viral máximo. Estas observaciones indican que la presencia de sitios de empalme es importante para la exportación nuclear del ARN lentiviral. El transporte del ARN lentiviral genómico desde el núcleo puede requerir la interacción con el espliceosoma y la proteína Rev. Los altos niveles de proteína Rev expresados a partir de vectores de empaquetamiento pueden garantizar que el ARN lentiviral de tamaño completo esté protegido del empalme y sea transportado para el empaquetamiento.

[0447] Por último, las regiones gag y env de la estructura principal del vector de transferencia se eliminaron en una serie de construcciones de vectores de transferencia recién modificadas para determinar la importancia de los elementos gag y env en el título viral infeccioso. Se crearon vectores de transferencia con deleciones de gag y env en 3' y 5' (es decir, mutantes -gag3', -gag5', -env3' y -env5') (**Figura 11A**) y, a continuación, cada vector se transdujo en

grupos separados de células. Se determinó el título viral para cada uno de los mutantes con delección de gag y/o env y se comparó con un vector de transferencia lentiviral de control (**Figura 11B**). Se encontró que los mutantes -env3' y -gag3'-env5' exhibieron una disminución en el título viral en relación con el vector de control, mientras que -env5' y -gag3' mostraron poca diferencia en el título viral. Estos resultados indican que las regiones 3' gag y 5' env pueden alterarse individualmente con solo un ligero efecto en el título viral, pero otros truncamientos de gag y env son perjudiciales para la eficacia del vector de transferencia.

Ejemplo 6. Diferencias de secuencia entre pNLV y pRRLSIN

[0448] El vector de transferencia pRRLSIN se modificó para generar el vector pNLV. Estas sustituciones e inserciones de nucleótidos se introdujeron para mejorar la eficacia y el perfil de bioseguridad del vector de transferencia lentiviral. En un ejemplo, la secuencia de psi de pNLV tiene las siguientes diferencias de secuencia en comparación con la secuencia pRRLSIN (**Figura 12A**): T771C, T784G, A785G, G788A, inserción de la secuencia de polinucleótidos "GAG" (792-794), A798C y G924A. pNLV tiene una secuencia de gag parcial que comienza en la posición 907 hasta la posición 1074. Además, pNLV tiene las siguientes diferencias de secuencia en esta región en comparación con pRRLSIN (**Figura 12B**): inserción de los siguientes nucleótidos: A968 y A969 (que dan como resultado un codón de terminación), así como las siguientes sustituciones: G924A, A949C, A950G, G989A, G992A, C995T, G998A, C999T, G1004A, C1007T, C1010A, T1058G y G1064A. pNLV también tiene una secuencia de env parcial que comienza en la posición 1083 hasta la posición 1228. En esta región, pNLV tiene la siguiente diferencia de secuencia en comparación con pRRLSIN (**Figura 12C**): C1105A.

[0449] La región RRE de pNLV tiene las siguientes diferencias de secuencia en comparación con pRRLSIN (**Figura 12D**): G1291C, A1332G y A1414G. pNLV tiene una región de env parcial (que contiene el sitio aceptor de empalme principal 7) que comienza en la posición 1479 hasta la posición 1961. Además, pNLV tiene las siguientes diferencias de secuencia en esta región de env parcial en comparación con pRRLSIN (**Figura 12E**): A1571C, T1575C y T1866C.

[0450] pNLV tiene una región cPPT que comienza en la posición 1971 hasta la posición 2118, y una secuencia de pol parcial (que contiene el sitio aceptor de empalme principal 1) que comienza en la posición 1974 hasta la posición 2151 (**Figura 12F**). En algunos casos, la región cPPT incluye una secuencia de 178 nucleótidos. En algunos casos, las secuencias de gag parcial, env parcial y/o pol parcial muestran una homología reducida con las secuencias virales de tipo salvaje en comparación con el vector parental, mejorando así el perfil de bioseguridad. Además, pNLV tiene las siguientes diferencias de secuencia en las inserciones dentro de las regiones cPPT y pol parcial en comparación con pRRLSIN: +A1971, +ACAAATGGCAG (1974-1984), +TTCATCC (1987-1993), +A1996, +A1997 y +CGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCACTTTGG (2116-2151).

[0451] Las diferencias de secuencia descritas anteriormente entre pNLV y pRRLSIN son aplicables cada una a pCINS y pNOX, en comparación con pRRLSIN, excepto por las diferencias en la región cPPT. Las posiciones precisas de los nucleótidos de las diferencias entre pCINS o pNOX, en relación con pRRLSIN, se pueden identificar mediante la alineación de las secuencias relevantes proporcionadas en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Vector de transferencia lentiviral que comprende las siguientes características en asociación operativa:

- (a) un promotor de citomegalovirus (CMV) que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 52;
 - (b) una región R de LTR que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 53;
 - (c) una región U5 de LTR que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 54;
 - (d) un sitio de unión a cebador que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 55;
 - (e) una señal de empaquetamiento (psi) que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 56;
 - (f) un sitio donante de empalme principal que comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 57, que está dentro de dicha señal de empaquetamiento;
 - (g) un polinucleótido que codifica al menos una parte de una proteína gag, en el que el polinucleótido comprende una secuencia inhibidora de INS1 mutada que reduce la restricción de la exportación nuclear de ARN con respecto a INS1 de tipo salvaje del aislado de VIH-1 NL4-3 o SF3, en el que dicho polinucleótido es una secuencia de gag parcial que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 58;
 - (h) una secuencia de env parcial que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 60;
 - (i) un elemento sensible a Rev que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 62;
 - (j) una secuencia de env parcial que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 64;
 - (k) un sitio aceptor de empalme que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 65, que está dentro de dicha secuencia de env parcial de la parte (j);
 - (l) un tracto central de polipurina (cPPT) que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con las SEQ ID NO: 67, 92 o 93;
 - (m) un sitio aceptor de empalme que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con las SEQ ID NO: 68 o 94, que está dentro de dicho tracto central de polipurina;
 - (n) un promotor EF1alfa que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 71 o 95;
 - (o) un sitio donante de empalme constitutivo (CD) que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 72, que está dentro de dicho promotor EF1alfa;
 - (p) un sitio aceptor de empalme constitutivo (CA) que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 73, que está dentro de dicho promotor EF1alfa;
 - (q) una secuencia de ácido nucleico heterólogo que (i) codifica una EGFP y comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 76, y/o (ii) comprende una secuencia de transgén;
 - (r) una secuencia de elemento regulador postranscripcional (PRE) que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 78 o 79;
 - (s) una secuencia de nef parcial que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 83;
 - (t) una secuencia de dU3 que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 84;
 - (u) una región R de LTR que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 85; y
 - (v) una región U5 de LTR que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 86;
- en el que el vector de transferencia lentiviral no comprende:
- (1) un polinucleótido que codifica las secuencias inhibidoras INS2, INS3 e INS4 de gag; ni
 - (2) un origen de replicación SV40 y/o un origen de replicación f1.

2. Vector de transferencia lentiviral según la reivindicación 1, en el que:

- (i) la secuencia de gag parcial incluye una inserción que da como resultado un desplazamiento de marco y una terminación prematura;
- (ii) la secuencia de gag parcial es adyacente a la señal de empaquetamiento (psi) o se superpone parcialmente con la misma y/o la secuencia de cPPT es de pol, cuyas secuencias se originan de manera opcional a partir del aislado NL4-3 o SF3 del VIH-1, de manera opcional en el que la secuencia de cPPT comprende aproximadamente 150-250 (por ejemplo, 178-181) nucleótidos y comprende la secuencia aceptora de empalme SA1; y/o
- (iii) el vector comprende además uno o más sitios de restricción ubicados entre elementos de dicho vector.

3. Vector de transferencia lentiviral, según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho elemento regulador postranscripcional (PRE) es un PRE del virus de la hepatitis B (HPRE) que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 79, y que comprende de manera opcional una mutación inactivadora en una secuencia codificante de proteína X.

4. Vector de transferencia lentiviral, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que:

(i) los componentes lentivirales de dicho vector de transferencia lentiviral se originan a partir del VIH-1;
 (ii) dicha secuencia de ácido nucleico heterólogo se encuentra en dirección 3' de una secuencia de Kozak; y/o
 (iii) la secuencia que codifica dicha al menos una parte de dicha proteína gag tiene menos del 90 % de identidad de secuencia con una región correspondiente de la proteína gag codificada por el plásmido de empaquetamiento pMDLgprRE.

5. Vector de transferencia lentiviral, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho transgén codifica una proteína.

6. Vector de transferencia lentiviral, según la reivindicación 5, en el que dicha proteína comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR), de manera opcional en el que dicho CAR comprende, en una dirección N-terminal a C-terminal, un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y uno o más dominios de señalización.

7. Vector de transferencia lentiviral, según la reivindicación 6, en el que dicho dominio de señalización comprende uno o más dominios de señalización primarios y/o uno o más dominios de señalización coestimuladores, de manera opcional, en el que:

(i) uno de dichos uno o más dominios de señalización primarios comprende un dominio estimulador CD3-zeta; y/o
 (ii) uno o más de dichos dominios de señalización coestimuladores comprende un dominio intracelular seleccionado entre una proteína coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, ICAM-1, antígeno asociado a la función linfocítica 1 (LFA-1), CD2, CD7, CD287, LIGHT, NKG2C, NKG2D, SLAMF7, NKp80, NKp30, NKp44, NKp46, CD160, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83, por ejemplo, dicho uno o más de dichos dominios de señalización coestimuladores comprende el dominio coestimulador 4-1BB (CD137) y/o el dominio coestimulador CD28.

8. Vector de transferencia lentiviral, según la reivindicación 6 o 7, en el que:

(i) dicho dominio de unión a antígeno es un scFv;

(ii) dicho dominio de unión a antígeno se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1; molécula 1 similar a lectina de tipo C, CD33; variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII); gangliósido G2 (GD2); gangliósido GD3; antígeno de maduración de células B (BCMA) miembro de la familia del receptor de TNF; antígeno Tn ((Tn Ag) o (GalNAc-Ser/Thr)); antígeno de membrana específico de próstata (PSMA); receptor huérfano 1 de tipo receptor de tirosina quinasa (ROR1); tirosina quinasa de tipo Fms 3 (FLT3); glucoproteína 72 asociada a tumores (TAG72); CD38; CD44v6; antígeno carcinoembrionario (CEA); molécula de adhesión de células epiteliales (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); Subunidad alfa-2 del receptor de interleucina-13; mesotelina; receptor alfa de interleucina 11 (IL-11Ra); antígeno de células madre prostáticas (PSCA); serina proteasa 21; receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2); antígeno de Lewis(Y); CD24; receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-beta); antígeno embrionario 4 específico de estadio (SSEA-4); CD20; receptor alfa de folato; receptor de proteína tirosina quinasa ERBB2 (Her2/neu); mucina 1, asociada a la superficie celular (MUC1); receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); molécula de adhesión celular neural (NCAM); prostasa; fosfatasa ácida prostática (PAP); factor de elongación 2 mutado (ELF2M); efrina B2; proteína alfa de activación de fibroblastos (FAP); receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (receptor de IGF-I), anhidrasa carbónica IX (CAIX); subunidad del proteasoma (prosome, macropaina), tipo beta, 9 (LMP2); glicoproteína 100 (gp100); proteína de fusión de oncogén que consiste en la región de agrupación de puntos de ruptura (BCR) y el homólogo 1 del oncogén viral de leucemia murina de Abelson (Abl) (bcr-abl); tirosinasa; receptor 2 de efrina tipo A (EphA2); fucosil GM1; molécula de adhesión de sialil Lewis (sLe); gangliósido GM3; transglutaminasa 5 (TGS5); antígeno asociado al melanoma de alto peso molecular (HMWMAA); gangliósido o-acetil-GD2 (OAcGD2); receptor beta de folato; marcador 1 de células endoteliales tumorales (TEM1/CD248); proteína relacionada con el marcador 7 de células endoteliales tumorales (TEM7R); claudina 6 (CLDN6); receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR); receptor acoplado a proteína G, clase C, grupo 5, miembro D (GPRC5D); marco de lectura abierto 61 del cromosoma X (CXORF61); CD97; CD179a; quinasa del linfoma anaplásico (ALK); ácido polisiálico; proteína específica de placenta 1 (PLAC1); parte hexasacárida de la gliceramida globoH (GloboH); antígeno de diferenciación de la glándula mamaria (NY-BR-1); uroplaquina 2 (UPK2); receptor celular 1 del virus de la hepatitis A (HAVCR1); adrenoceptor beta 3 (ADRB3); panexina 3 (PANX3); receptor 20 acoplado a proteína G (GPR20); complejo 6 de antígeno linfocítico, locus K 9 (LY6K); receptor olfativo 51E2 (OR51E2); proteína de marco de lectura alternativo de TCR gamma (TARP); proteína del tumor de Wilms (WT1); Antígeno 1 de cáncer de testículo (NY-ESO-1); Antígeno 2 de cáncer de testículo (LAGE-1a); Antígeno 1 asociado al melanoma (MAGE-A1); gen 6 de la variante de translocación de ETS, ubicado en el cromosoma 12p (ETV6-AML); Proteína espermática 17 (SPA17); Familia de antígenos X, Miembro 1A (XAGE1); receptor de superficie celular de unión a angiopoyetina 2 (Tie 2); antígeno 1 de cáncer de testículo derivado de melanoma (MAD-CT-1); antígeno 2 de cáncer de testículo derivado de melanoma (MAD-CT-2); antígeno relacionado con Fos 1; proteína tumoral p53 (p53); mutante p53; prosteína; superviviente; telomerasa; antígeno tumoral 1 de carcinoma de próstata, antígeno de melanoma reconocido por células T 1; mutante de sarcoma de rata (Ras); telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT); puntos de corte de translocación del sarcoma; inhibidor de apoptosis de melanoma (ML-IAP); ERG (proteasa transmembrana, serina 2 (TMPRSS2), gen de fusión de ETS); N-acetil glucosaminil-transferasa V (NA17); proteína de caja pareada Pax-3 (PAX3); receptor de andrógenos; ciclina B1; homólogo derivado del neuroblastoma del oncogén viral de mielocitomatosis aviar v-myc (MYCN); miembro C de la familia de homólogos de Ras (RhoC); proteína 2 relacionada con la tirosinasa (TRP-2); citocromo P450 1B1 (CYP1B1); antígeno 3 de carcinoma de células escamosas similar al factor de unión a CCCTC (proteína de dedo de

zinc) reconocido por células T (SART3); proteína de caja emparejada Pax-5 (PAX5); proteína de unión a proacrosina sp32 (OY-TES1); proteína tirosina quinasa específica de linfocitos (LCK); proteína de anclaje de quinasa A 4 (AKAP-4); sarcoma sinovial, punto de corte X 2 (SSX2); receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE-1); renal ubicuo 1 (RU1); renal ubicuo 2 (RU2); legumain; virus del papiloma humano E6 (HPV E6); virus del papiloma humano E7 (HPV E7); carboxil esterasa intestinal; proteína de choque térmico 70-2 mutada (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; receptor tipo inmunoglobulina asociada a leucocitos 1 (LAIR1); fragmento Fc del receptor de IgA (FCAR o CD89); miembro 2 de la subfamilia A de receptores de tipo inmunoglobulina leucocitaria (LILRA2); miembro f de la familia de moléculas similares a CD300 (CD300LF); miembro A de la familia 12 del dominio de lectina de tipo C (CLEC12A); antígeno 2 de células estromales de la médula ósea (BST2); receptor de hormona 2 similar a mucina que contiene módulo de tipo EGF (EMR2); antígeno linfocítico 75 (LY75); glipicano-3 (GPC3); proteína 5 de tipo receptor Fc (FCRL5); y polipéptido 1 de tipo inmunoglobulina lambda 1 (IGLL1); por ejemplo, en el que dicho dominio de unión al antígeno se une a CD19, mesotelina o CD123; y/o

(iii) dicho CAR comprende un anticuerpo anti-CD19 o un fragmento del mismo, un dominio transmembrana 4-1BB (CD137) y un dominio de señalización CD3-zeta.

9. Vector de transferencia lentiviral, según la reivindicación 1, en el que:

(i) el vector comprende, de 5' a 3', los siguientes elementos en asociación operativa:

dicho promotor de CMV,

dicha región R de LTR que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 53,

dicha región U5 de LTR que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 54,

dicho sitio de unión a cebador (PBS),

dicha señal de empaquetamiento (psi) que comprende un sitio donante de empalme principal (SD),

dicha secuencia de gag parcial,

dicha secuencia de env parcial,

dicho elemento sensible a Rev (RRE),

dicha secuencia de env parcial que comprende un sitio aceptor de empalme (SA7),

dicho tracto central de polipurina (cPPT) que comprende un sitio aceptor de empalme (SA1),

dicho promotor EF1a,

dicha secuencia de ácido nucleico heterólogo,

dicho elemento regulador postranscripcional,

dicha región R de LTR que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 85,

dicha región U5 de LTR comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 86,

y uno o más de los siguientes elementos:

una cola de poliA de SV40,

un gen de resistencia a la kanamicina (nptII) y

un origen de replicación pUC; y/o

(ii) dicho transgén codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), de manera opcional en el que dicho CAR comprende un anticuerpo anti-CD19 o un fragmento del mismo, un dominio transmembrana 4-1BB (CD137) y un dominio de señalización CD3-zeta.

10. Célula huésped que comprende el vector de transferencia lentiviral de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Célula huésped, según la reivindicación 10, en la que dicha célula huésped:

(i) es una célula 293T, una célula T Jurkat o una célula T humana primaria; y/o

(ii) comprende además uno o más vectores de empaquetamiento lentivirales.

12. Composición que comprende un vector de transferencia lentiviral, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y uno o más vectores de empaquetamiento.

13. Procedimiento para producir un lentivirus capaz de expresar una secuencia de ácido nucleico heterólogo, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) introducir en una célula, por ejemplo una célula 293T, una célula T Jurkat o una célula T humana primaria:

(i) el vector de transferencia lentiviral de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, y

(ii) uno o más vectores de empaquetamiento lentivirales; y

(b) expresar proteínas virales codificadas por dicho vector de transferencia lentiviral y/o dicho vector de empaquetamiento en dicha célula, produciendo de este modo un lentivirus que comprende la secuencia de ácido nucleico heterólogo de dicho vector de transferencia lentiviral.

FIG. 1

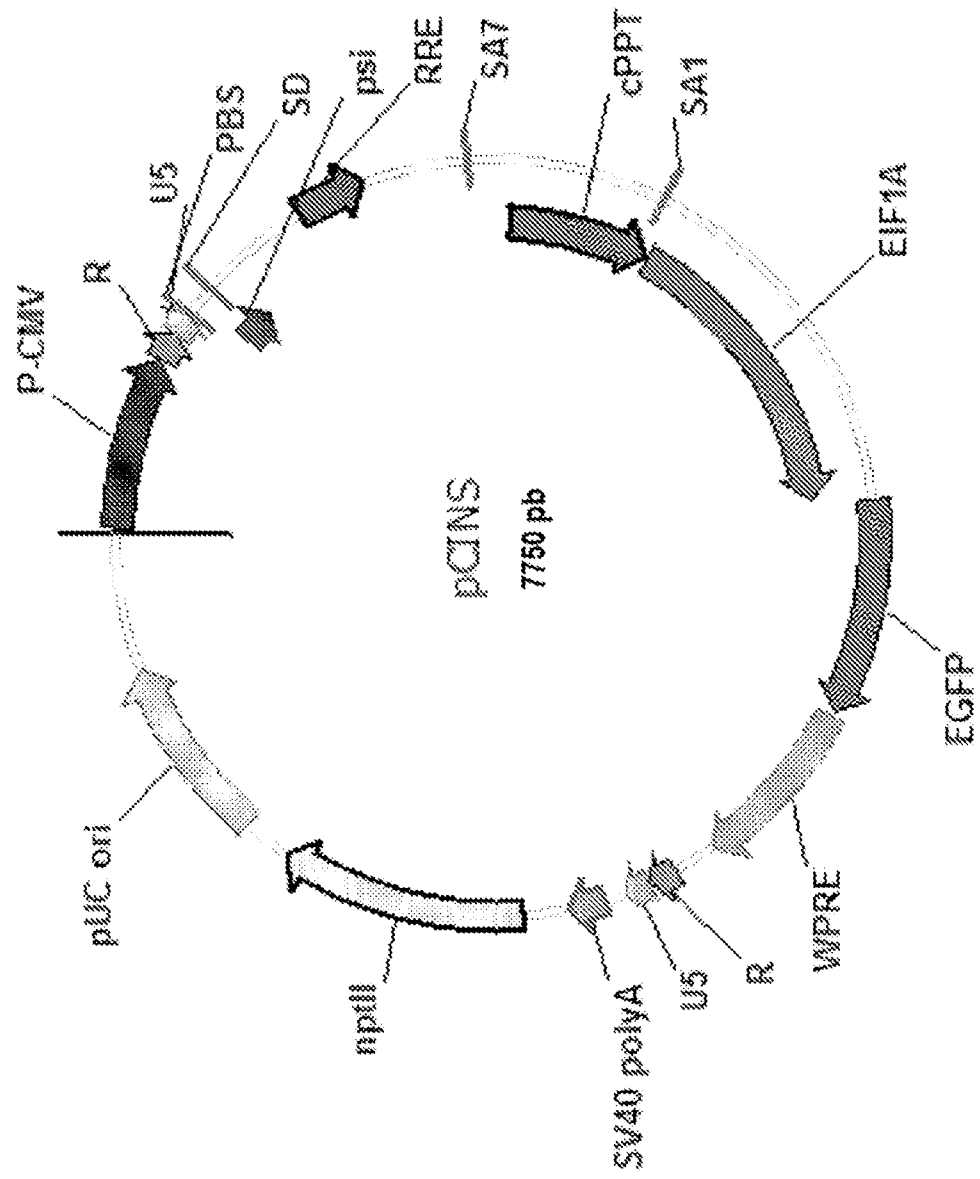


FIG. 2

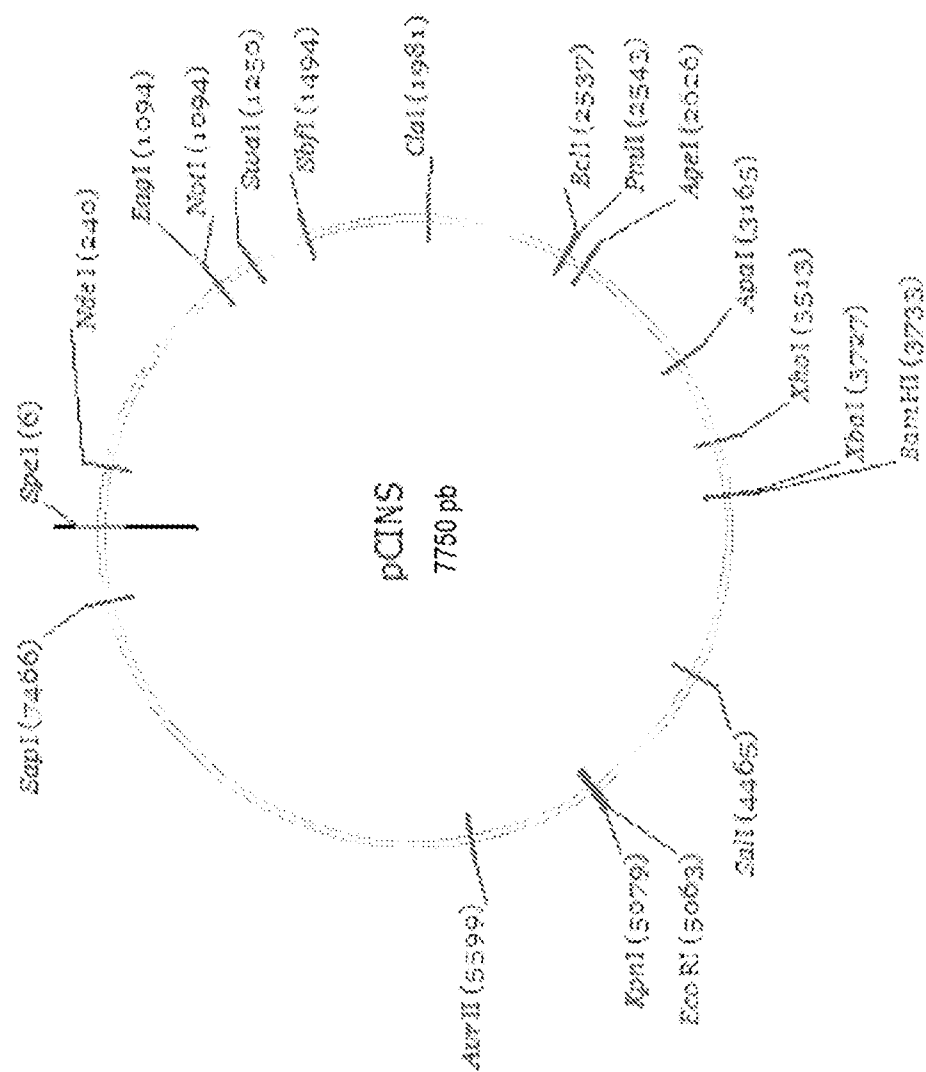


FIG. 3

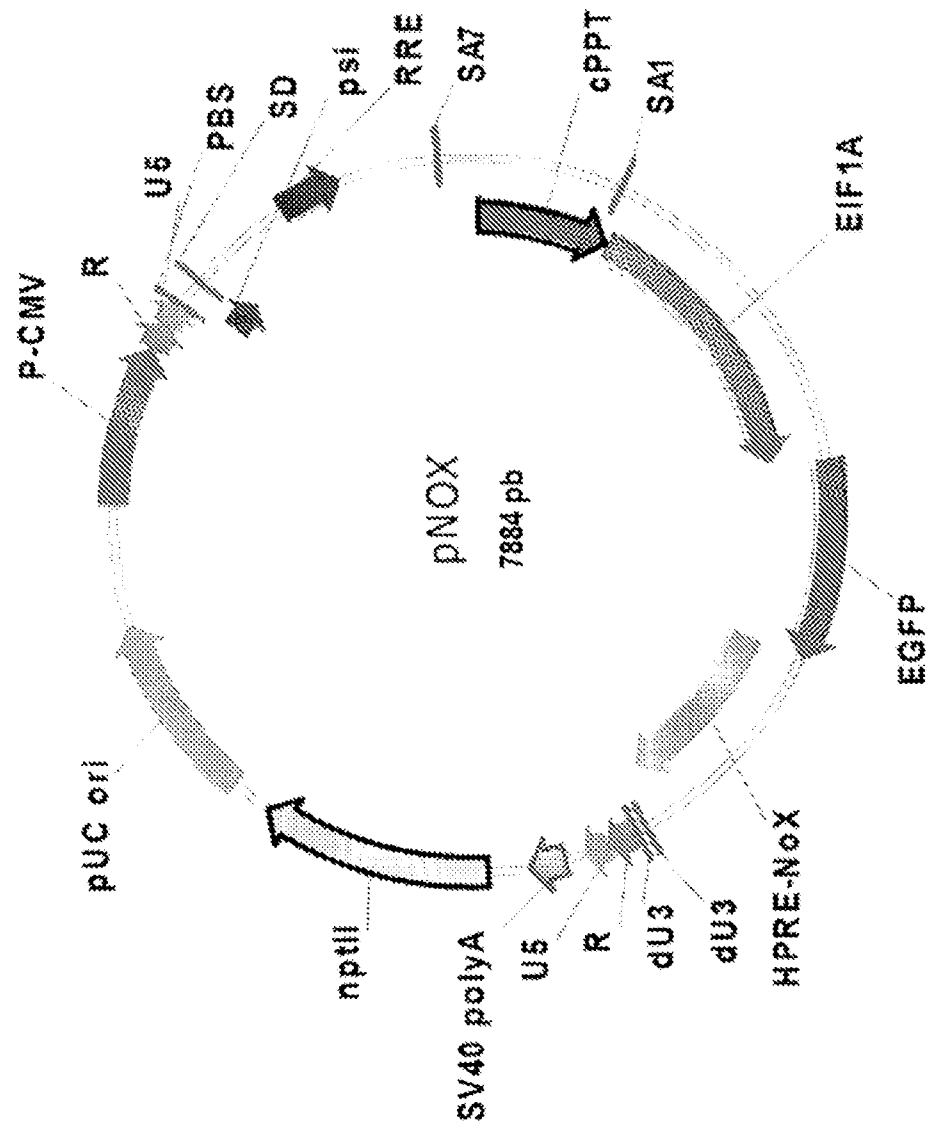


FIG. 4

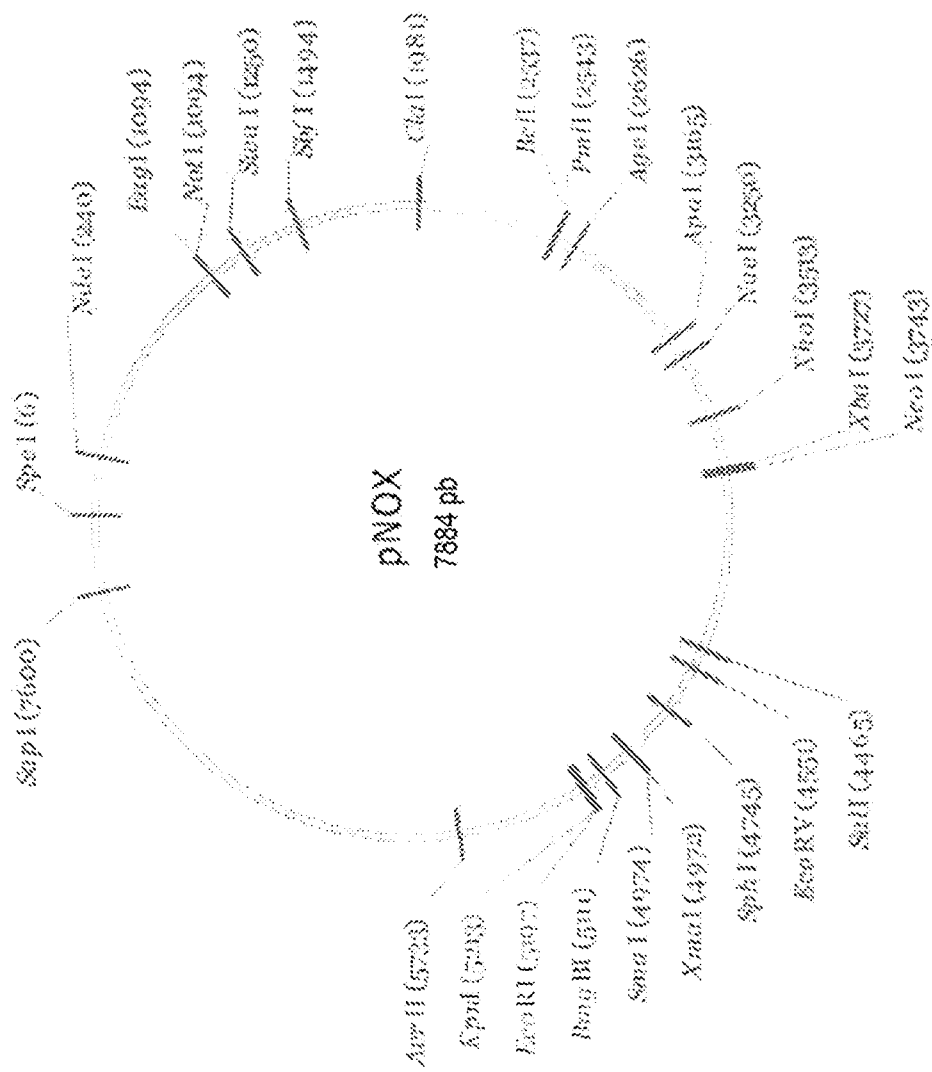


FIG. 5A-5E

FIG. 5A

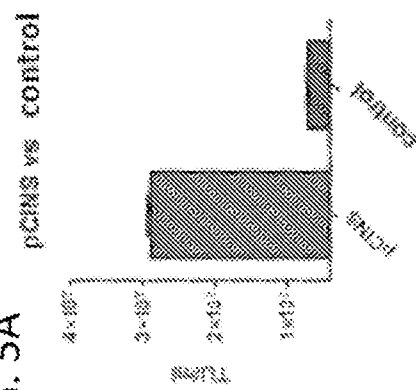


FIG. 5B

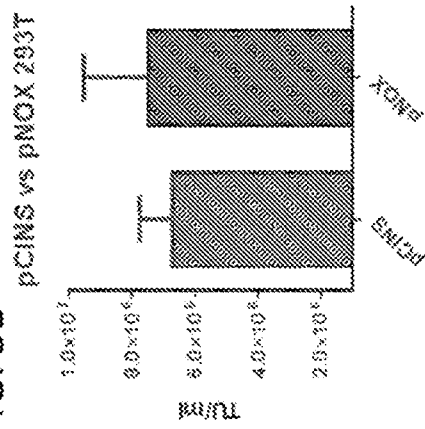


FIG. 5C

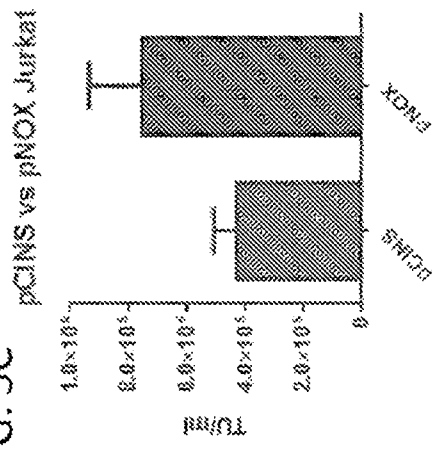


FIG. 5D

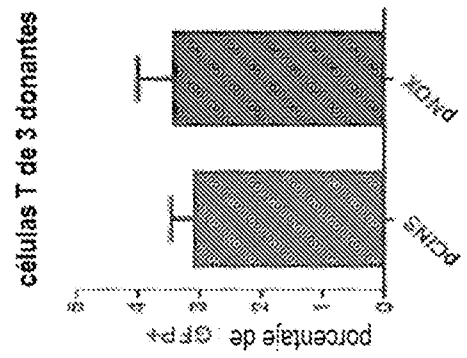


FIG. 5E

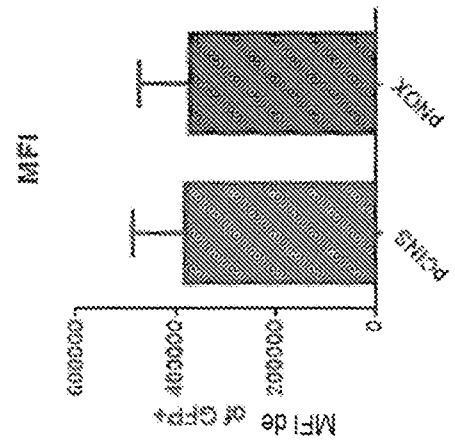


FIG. 6

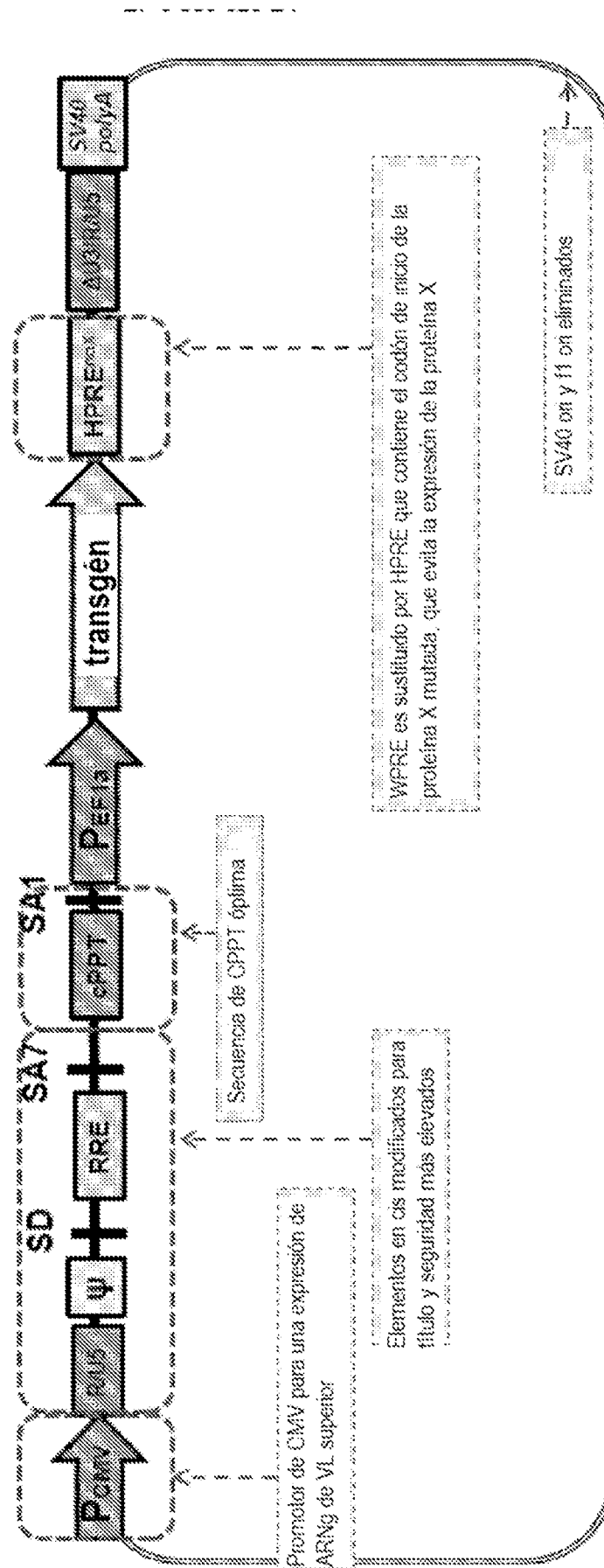


FIG. 7A-7B

FIG. 7A

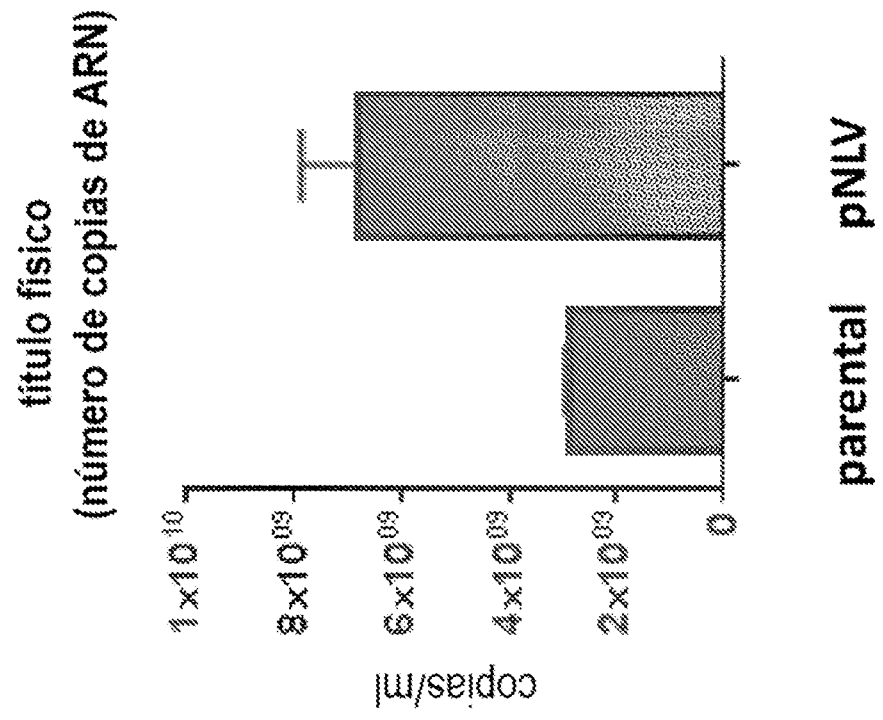


FIG. 7B

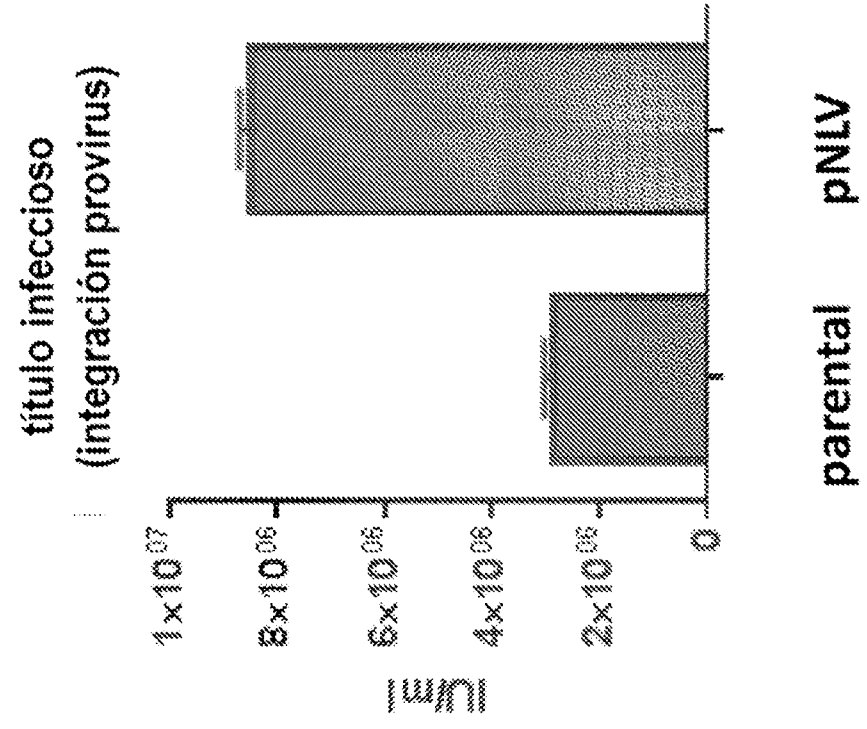


FIG. 8A-8C

FIG. 8A

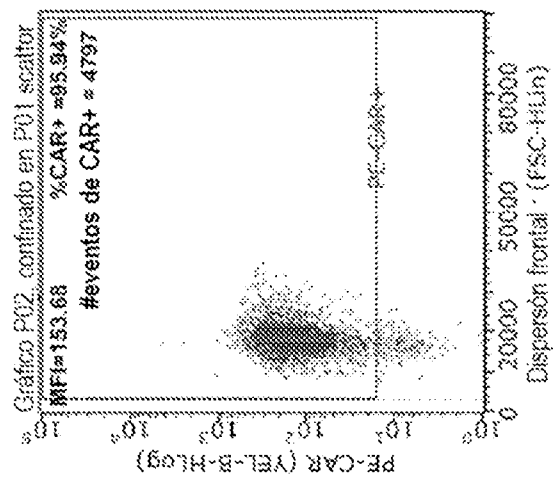


FIG. 8B

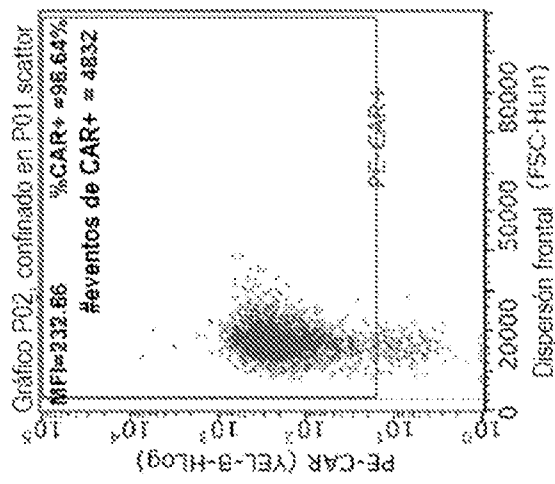


FIG. 8C

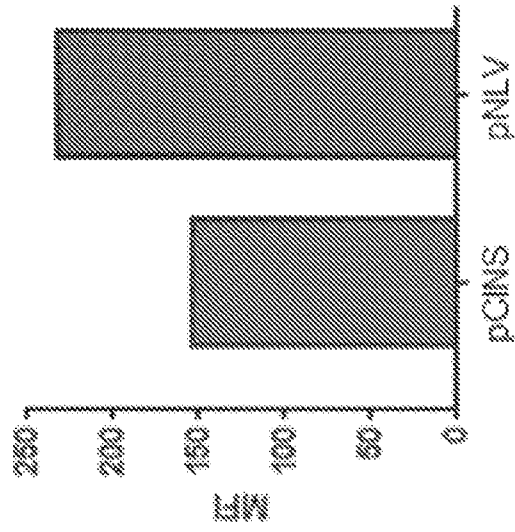


FIG. 9A-9E

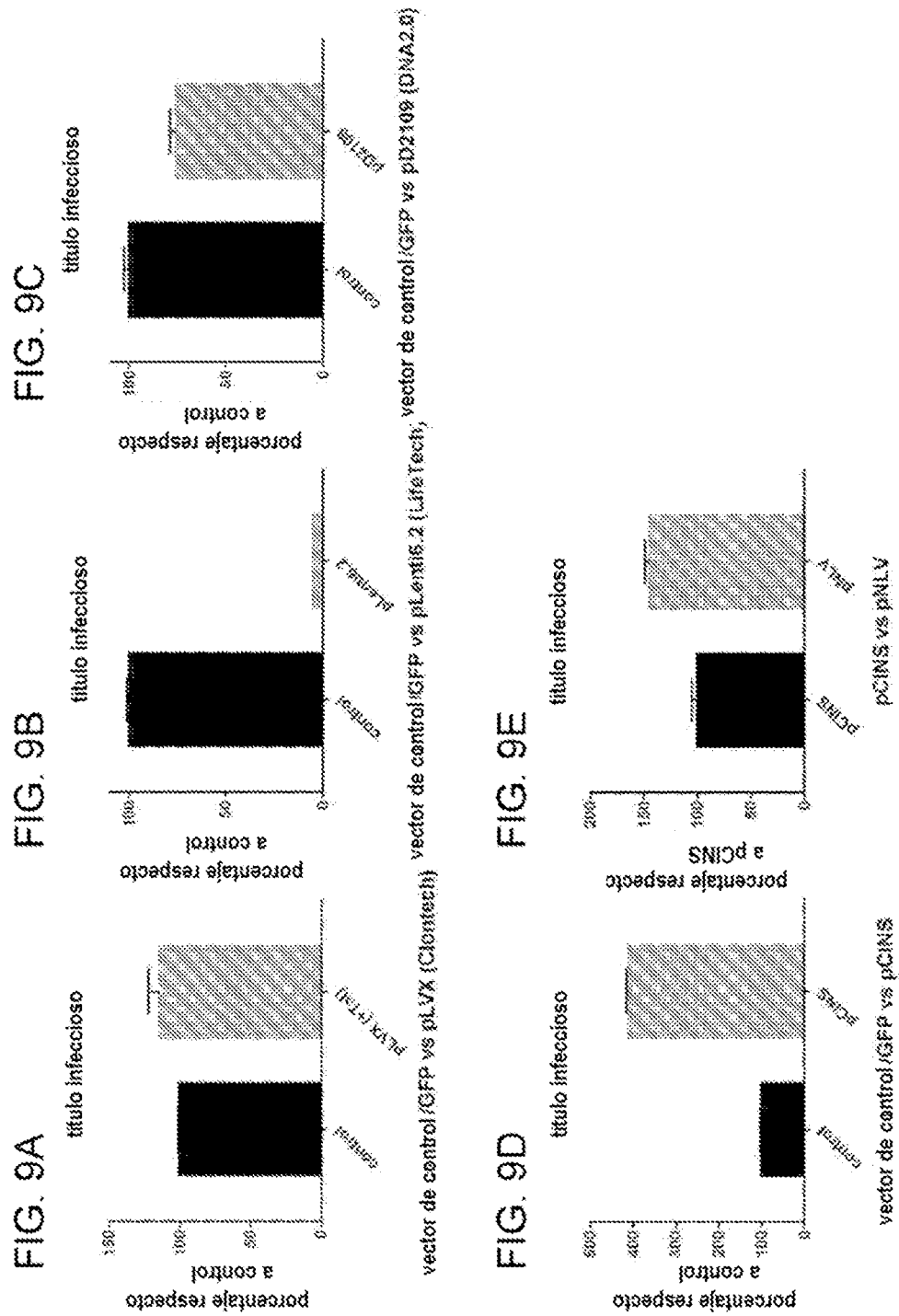


FIG. 10A-10B

FIG. 10A

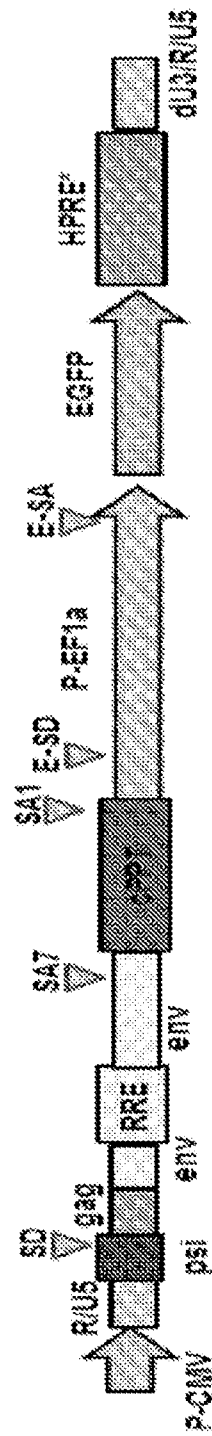


FIG. 10B

titulo infeccioso

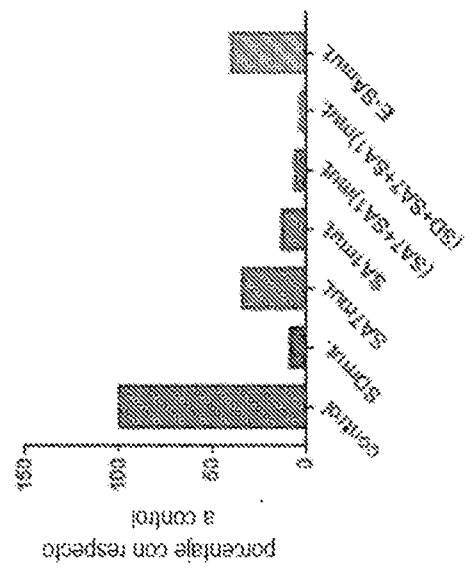


FIG. 11A-11B

FIG. 11A

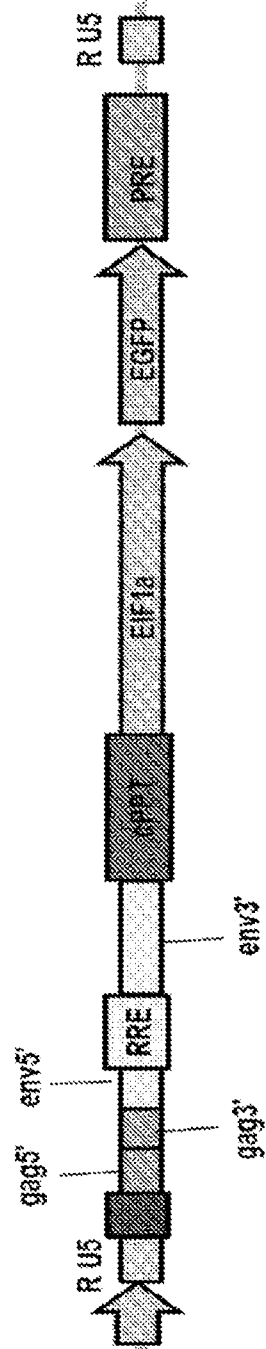
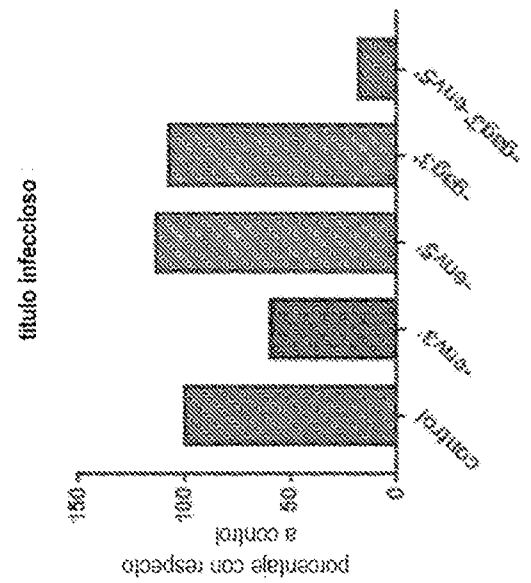


FIG. 11B



[illegible]

FIG. 12B

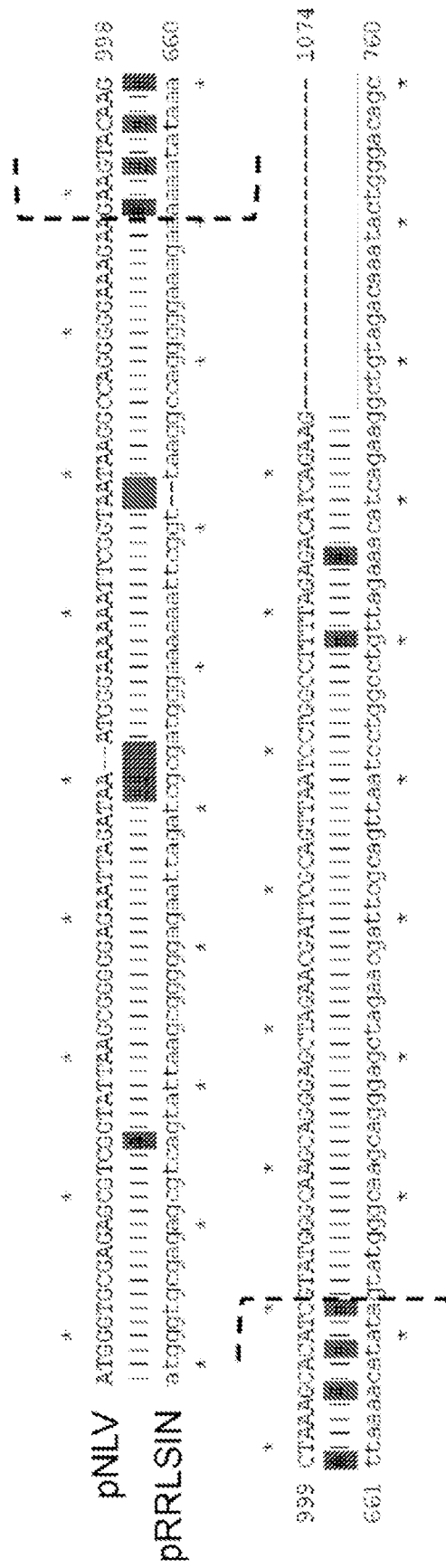


FIG. 12D

[illegible]

[illegible]

FIG. 12F

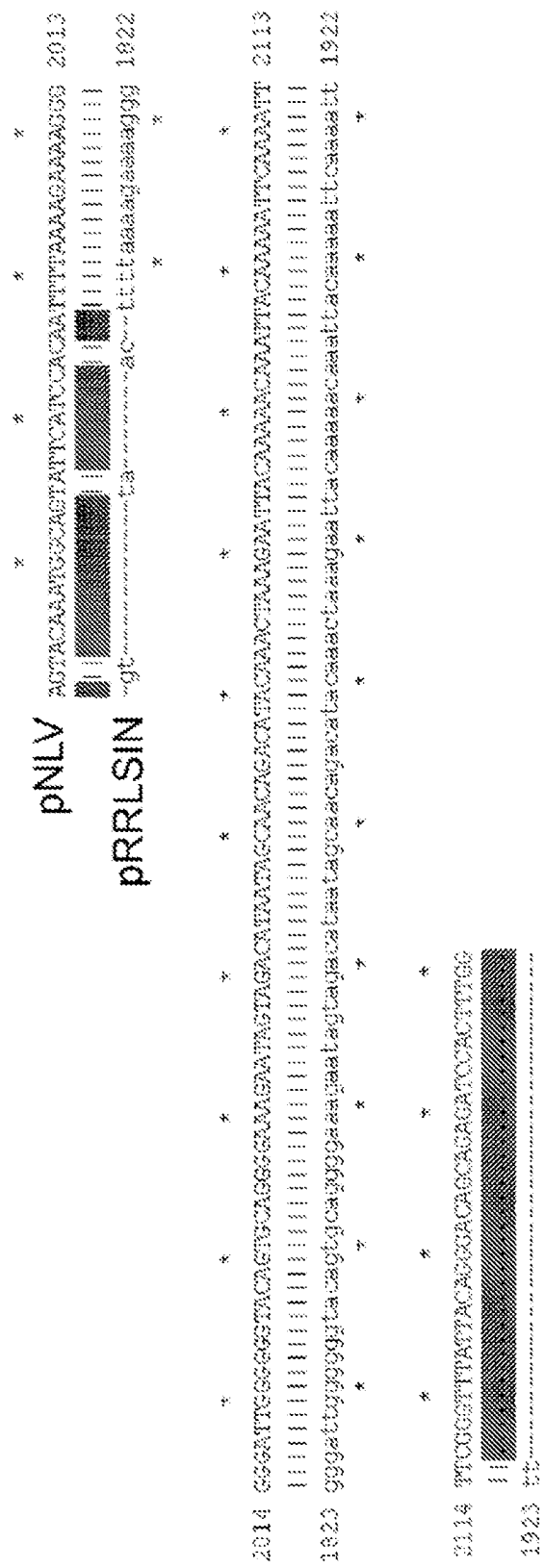


Fig. 13

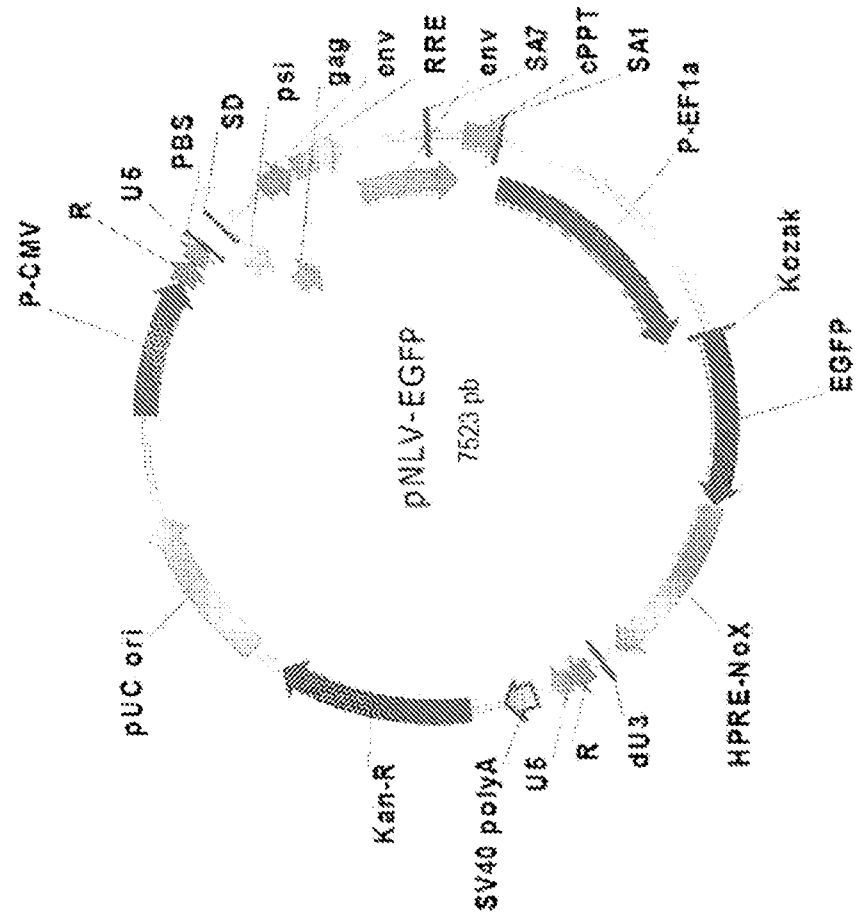


Fig. 14

