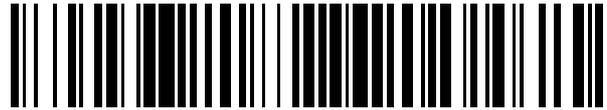


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 835 232**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2013 PCT/US2013/050293**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14012001**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2013 E 13816739 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2020 EP 2872184**

54 Título: **CART19 para la utilización en un método de reducción del número de células B normales para la inducción de tolerancia**

30 Prioridad:

13.07.2012 US 201261671508 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.06.2021

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (100.0%)
Center for Technology Transfer, 3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

**LEVINE, BRUCE, L.;
KALOS, MICHAEL, D. y
JUNE, CARL, H.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 835 232 T3

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

DESCRIPCIÓN

CART19 para la utilización en un método de reducción del número de células B normales para la inducción de tolerancia

5

Antecedentes de la invención

Mediante la utilización de tecnologías de transferencia génica, las células T pueden modificarse genéticamente para expresar establemente dominios de unión a anticuerpo sobre la superficie que confieren nuevas especificidades de antígeno que son independientes del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Los receptores de antígeno quimérico (CAR, por sus siglas en inglés) son una aplicación de dicho enfoque que combina un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico y un dominio intracelular de la cadena CD3-z o proteína FcγRI en una única proteína quimérica (Gross et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10024-10028, 1989; Irving et al., Cell 64: 891-901, 1991). Actualmente se están llevando a cabo ensayos de CAR en varios centros médicos académicos (Kohn et al., Mol. Ther. 19: 432-438, 2011; Jena et al., Blood 116: 1035-1044, 2010). En la mayoría de cánceres, los antígenos específicamente tumorales no han sido bien definidos todavía, aunque en las neoplasias malignas de células B, CD19 es una diana tumoral atractiva. La expresión de CD19 se restringe a las células B normales y malignas (Uckun et al., Blood 71: 13-29, 1988) y CD19 es una diana ampliamente aceptada para el ensayo seguro de los CAR. Aunque los CAR pueden inducir la activación de células T de una manera similar a un receptor de células T endógeno, un impedimento importante a la aplicación clínica de esta tecnología hasta hoy ha sido la limitada expansión *in vivo* de las células T CAR⁺, la rápida desaparición de las células tras la infusión y la decepcionante actividad clínica (Jena et al., Blood 116: 1035-1044, 2010; Sadelain et al., Curr. Opin. Immunol. 21: 215-223, 2009).

Las respuestas de células T mediadas por CAR pueden potenciarse adicionalmente con la adición de dominios coestimuladores. En un modelo preclínico, la inclusión del dominio de señalización de CD137 (4-1BB) se ha encontrado que incrementa significativamente la actividad antitumoral y la persistencia *in vivo* de los CAR en comparación con la inclusión de la cadena Cd3-z por sí sola (Milone et al., Mol. Ther. 17, 1453-1464, 2009; Carpenito et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106: 3360-3365, 2009). Con el fin de evaluar la seguridad y viabilidad para la transferencia adoptiva de células T modificadas genéticamente para expresar dichos CAR, se llevó a cabo un ensayo clínico piloto utilizando células T autólogas que expresaban un CAR anti-CD19 que incluía CD3-z y dominio coestimulador 4-1BB (células CART19) para el tratamiento dirigido de las neoplasias malignas CD19⁺. Se han tratado tres pacientes bajo este protocolo. Algunos de los resultados obtenidos de estos pacientes se indican en (Porter et al., N. Engl. J. Med. 365: 8, 2011), que informa de dicho tratamiento resulta en la regresión tumoral, la persistencia de las células CART19 y la aparición inesperada del síndrome de lisis tumoral retardado. También se observó que las células CART19 mediaban en potentes efectos clínicos antitumorales en la totalidad de los tres pacientes tratados. De promedio, cada célula T CAR infundida y/o su progenie eliminó más de 1000 células de leucemia *in vivo* en pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) resistente a quimioterapia avanzada. Las células CART19 experimentaron una robusta expansión *in vivo* de las células T, que persistió a niveles elevados durante por lo menos 6 meses en sangre y médula ósea (MO), continuó expresando receptores funcionales sobre las células con un fenotipo de memoria y mantuvo la función efectora anti-CD19 *in vivo*. Sin embargo, todavía sigue sin entenderse cómo las células CART19 evitan el rechazo por el huésped humano, dado que el constructo de CART19 contiene tanto secuencias murinas (los determinantes de anticuerpo) como fragmentos de unión únicos entre los diferentes componentes del constructo de CART19.

De esta manera, sigue existiendo la necesidad en la técnica de conocer el mecanismo de persistencia a largo plazo de las células CART19 y por qué dichas células no resultan rechazadas por el huésped humano. La presente invención satisface dicha necesidad.

Descripción resumida de la invención

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona una célula genéticamente modificada para expresar un CAR anti-CD19 en el que el CAR comprende un dominio de unión al antígeno CD19, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización CD3zeta, para la utilización en un método de prevención o retraso del rechazo de un tejido u órgano trasplantado en un sujeto, en el que el método comprende administrar en el sujeto una cantidad eficaz de dicha célula modificada genéticamente antes, simultáneamente o después de la administración del tejido u órgano trasplantado, en el que el dominio de unión al antígeno CD19 presenta como diana el marcador de superficie de célula B CD19, en el que la célula modificada genéticamente reduce el número de células B, y en el que la aplasia de células B se sostiene durante dieciocho meses después de la administración de la célula modificada genéticamente en el sujeto, en el que el tejido u órgano es el corazón, una válvula cardíaca, pulmón, riñón, hígado, páncreas, intestino, piel, vaso sanguíneo, médula ósea, célula madre, o célula ósea o de islote.

Según el primer aspecto de la invención, el método para prevenir o retrasar el rechazo de un tejido u órgano trasplantado en un sujeto puede comprender además la administración de una célula modificada genéticamente en dicho tejido u órgano antes de que dicho tejido u órgano sea trasplantado en el sujeto. El método de prevención o retraso del rechazo de un tejido u órgano trasplantado en un sujeto puede comprender además la evaluación de la presencia de células expresantes de CAR en el sujeto por lo menos una vez doce o dieciocho meses después de la

65

administración de la célula modificada genéticamente para expresar un CAR anti-CD19. El método de prevención o retraso del rechazo de un tejido u órgano trasplantado en un sujeto puede comprender además la evaluación de la reducción del número de células B en el sujeto por lo menos una vez doce o dieciocho meses después de la administración de la célula modificada genéticamente para expresar un CAR anti-CD19.

5 Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona una célula genéticamente modificada para expresar un CAR anti-CD19 en el que el CAR comprende un dominio de unión al antígeno CD19, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización CD3zeta, para la utilización en un método de tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) en un sujeto que ha recibido un trasplante de tejido u órgano, en el que el método comprende administrar en el sujeto una cantidad eficaz de dicha célula modificada genéticamente antes, simultáneamente o después de la administración del tejido u órgano trasplantado, en el que el dominio de unión al antígeno CD19 presenta como diana el marcador de superficie de célula B CD19, en el que la célula modificada genéticamente reduce el número de células B, tratando de esta manera la EICH en el sujeto, y en el que la aplasia de células B se sostiene durante dieciocho meses después de la administración de la célula modificada genéticamente en el sujeto, en el que el tejido u órgano es el corazón, una válvula cardíaca, pulmón, riñón, hígado, páncreas, intestino, piel, vaso sanguíneo, médula ósea, célula madre, o célula ósea o de islote.

20 Según el segundo aspecto de la invención, la célula modificada genéticamente puede administrarse simultáneamente al tejido u órgano trasplantado, antes de la administración del tejido u órgano trasplantado, o después de la administración del tejido u órgano trasplantado. El método para el tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) puede comprender además la administración de dicha célula modificada genéticamente en un tejido u órgano antes de que dicho tejido u órgano sea trasplantado en el sujeto. El método de tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) puede comprender además la evaluación de la presencia de células expresantes de CAR en el sujeto por lo menos una vez doce o dieciocho meses después de la administración de la célula modificada genéticamente para expresar un CAR anti-CD19. El método de tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) puede comprender además la evaluación de la reducción del número de células B en el sujeto por lo menos una vez doce o dieciocho meses después de la administración de la célula modificada genéticamente para expresar un CAR anti-CD19.

30 La exposición describe un método de reducción del número de células B en un sujeto. En una realización, el método comprende administrar en un sujeto una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un CAR, en el que el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta, en el que el dominio de unión a antígeno presenta como diana un marcador de superficie de célula B, reduciendo de esta manera el número de células B en el sujeto.

35 La exposición describe un método de estimulación de la tolerancia en un sujeto. En una realización, el método comprende administrar en un sujeto una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un CAR, en el que el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta, en el que el dominio de unión a antígeno presenta como diana un marcador de superficie de célula B, reduciendo de esta manera la tolerancia en el sujeto.

En una realización, la tolerancia es tolerancia al trasplante de un tejido trasplantado.

45 En una realización, la célula modificada genéticamente reduce el número de células B.

En una realización, la célula modificada genéticamente se administra simultáneamente al tejido trasplantado.

En una realización, la célula modificada genéticamente se administra antes de la administración del tejido trasplantado.

50 En una realización, la célula modificada genéticamente se administra después de la administración del tejido trasplantado.

55 La exposición describe un método para tratar la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH). En una realización, el método comprende administrar una célula modificada genéticamente para expresar un CAR en un sujeto que lo necesita, en el que el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta, en el que el dominio de unión a antígeno presenta como diana un marcador de superficie de célula B, tratando de esta manera la EICH en el sujeto.

60 En una realización, la célula modificada genéticamente reduce el número de células B.

En una realización, la célula modificada genéticamente se administra simultáneamente al tejido trasplantado.

En una realización, la célula modificada genéticamente se administra antes de la administración del tejido trasplantado.

65 En una realización, la célula modificada genéticamente se administra después de la administración del tejido trasplantado.

Breve descripción de los dibujos

La descripción detallada siguiente de realizaciones preferentes de la invención se entenderá mejor leída junto con los dibujos adjuntos. Para el propósito de ilustrar la invención, en los dibujos se muestran realizaciones actualmente preferentes. Sin embargo, debe entenderse que la invención no se encuentra limitada a las configuraciones e instrumentos precisos de las realizaciones mostradas en los dibujos.

La figura 1, que comprende las figuras 1A a 1F, es una serie de imágenes que demuestra la expansión y persistencia *in vivo* sostenidas en sangre y médula de células CART19. El ADN aislado a partir de sangre completa tal como se ilustra en la figura 1A a 1C o médula tal como se ilustra en la figura 1D a 1F, muestras obtenidas de UPN 01 tal como se ilustra en las figuras 1A y 1D; UPN 02 tal como se ilustra en las figuras 1B y 1E, y UPN 03, tal como se ilustra en las figuras 1C y 1F, se sometió en masa a análisis de Q-PCR utilizando un ensayo cualificado para detectar y cuantificar las secuencias de CART19. Cada punto de datos representa la media de mediciones por triplicado en 100 a 200 ng de ADN genómico con CV en % máximo de 1,56%. Los parámetros de pasa/falla para el ensayo incluían intervalos preestablecidos de pendiente y eficiencia de amplificación, y la amplificación de una muestra de referencia. El límite inferior de cuantificación para el ensayo establecido por el intervalo estándar de la curva era 2 copias de transgén/microgramo de ADN genómico: los valores de la muestra inferiores a ese número se consideran estimaciones y se presentan en el caso de que por lo menos 2/3 réplicas generen un valor de Ct con CV en % para los valores de 15%. Se infundieron células CART19 los días 0, 1 y 2 para UPN 01 y UPN 03 y los días 0, 1, 2 y 11 para UPN 02.

La figura 2, que comprende las figuras 2A a 2C, es una serie de imágenes que ilustra la expresión prolongada de CART19 en superficie y el establecimiento de CAR de memoria funcionales *in vivo*. La figura 2A ilustra la detección de linfocitos CD3⁺ expresantes de CAR y la ausencia de células B en la periferia y en la médula. Las células mononucleares de sangre periférica o médula recién procesadas obtenidas de UPN 03 el día 169 post-infusión de células CART19 se evaluaron mediante citometría de flujo para la expresión en superficie de CAR19 (parte superior) o la presencia de células B (parte inferior); como control, se tiñeron PBMC obtenidas de un donante sano, ND365. Para evaluar la expresión de CAR19 en linfocitos CD3⁺, se cotiñeron muestras con anticuerpos de CD14-PE-Cy7 y CD16-PE-Cy7 (canal de descarte) y CD3-FITC, seleccionados positivamente en CD3⁺, y evaluados para la expresión de CAR19 en los compartimientos de linfocitos CD8⁺ y CD8⁻ mediante cotinción con CD8a-PE y el anticuerpo idiotípico anti-CAR19 conjugado con Alexa-647. Los datos en los gráficos se seleccionaron de la población de células negativas para el canal de descarte/positivas para CD3. Con el fin de evaluar la presencia de células B, las muestras se cotiñeron con anticuerpos de CD14-APC y CD3-FITC (canales de descarte) y se evaluaron para la presencia de células B en la fracción negativa para el canal de descarte mediante cotinción con anticuerpos de CD20-PE y CD19-PE-Cy-7. En todos los casos, se establecieron cuadrantes de selección negativa en controles de no tinción, tal como se ilustra en las figuras 2B y 2C. Se muestra el inmunofenotipado de células T de subgrupos de células T CD4⁺ (figura 2B) y CD8⁺ (figura 2C). Muestras congeladas de sangre periférica de UPN 03 obtenidas mediante aféresis los días 56 y 169 después de la infusión de células T se dejaron en reposo durante la noche en medio de cultivo sin factores añadidos, se lavaron y se sometieron a inmunofenotipado multiparamétrico para la expresión de marcadores de memoria, activación y agotamiento de células T. La estrategia de clasificación en grupos ('gating'), tal como se ilustra en la figura 6, implicó una selección inicial en el canal de descarte de células negativas para (CD14, CD16, Live/Dead-Aqua) y positivas para CD3, seguido de grupos positivos de células CD4⁺ y CD8⁺. Los grupos y cuadrantes se establecieron utilizando controles FMO (CAR, CD45RA, PD-1, CD25, CD127, CCR7) o mediante acotamiento de grupos de poblaciones de células positivas (CD3, CD4, CD8) y subgrupos claramente delineados (CD27, CD28, CD57); los datos se representaron tras la transformación biexponencial para la visualización objetiva de los sucesos. Se muestra la competencia funcional de las células CAR persistentes en los experimentos siguientes. Las muestras congeladas de sangre periférica de UPN 03 obtenidas mediante aféresis los días 56 y 169 después de la infusión de células T se dejaron en reposo durante la noche en medio de cultivo sin factores añadidos, se lavaron y se evaluaron directamente *ex vivo* para la capacidad de reconocer dianas celulares expresantes de CD19 utilizando ensayos de desgranulación de CD107. Tras una incubación de dos horas en presencia de anti-CD28, anti-CD49d y CD107-FITC, se recolectaron las mezclas de células, se lavaron y se sometieron a análisis multiparamétrico de citometría de flujo a fin de evaluar la capacidad de las células CART19 de desgranularse en respuesta a dianas expresantes de CD19. La estrategia de acotamiento de grupos implicó una selección inicial en canales de descarte de células negativas para (CD14-PE-Cy7, CD16-PE-Cy7, Live/Dead-Aqua) y células positivas para CD3-PE, seguido del acotamiento de grupos en células positivas para CD8-PE-rojo Texas; los datos presentados son para la población acotada CD8⁺. En todos los casos, se establecieron cuadrantes de selección negativa en controles de no tinción.

La figura 3, que comprende las figuras 3A a 3C, es una serie de imágenes que ilustran los resultados de experimentos que evalúan las respuestas clínicas tras la infusión de células CART19. La figura 3A ilustra que UPN 02 se trató con dos ciclos de rituximab y bendamustina con una respuesta mínima (R/B, flecha). Se infundieron células T CART19 a partir de los 4 días posteriores a bendamustina sola (B, flecha). La leucemia resistente a rituximab y bendamustina resultó rápidamente lavada de la sangre, tal como indicaba una reducción del recuento absoluto de linfocitos (CAL) de 60.000/μl a 200/μl dentro de los 18 días posteriores al inicio de la infusión. Se inició el tratamiento de corticoesteroides el día 18 después de la infusión debido a malestar y síndrome febril no infeccioso. La línea de referencia (de puntos) indica el límite superior de la normalidad para el CAL. La figura 3B ilustra los resultados de los experimentos de ejemplo de tinción de la biopsia secuencial de médula ósea o

especímenes de coágulos de los pacientes UPN 01 y 03 para CD20. La infiltración de pretratamiento con leucemia presente en ambos pacientes se encontraba ausente en especímenes post-tratamiento acompañada de normalización de la celularidad y hematopoyesis trilineal. En UPN 01 no se detectaron células LLC según evaluación mediante citometría de flujo, citogenética e hibridación in situ fluorescente o se detectaron células B normales mediante citometría de flujo en médula ósea o sangre. UPN 03 presentaba 5% de células B CD5-negativas normales residuales, confirmado mediante citometría de flujo, el día +23, que también mostró que eran policlonales; no se detectaron células B normales el día +176. La figura 3C ilustra los resultados de experimentos que utilizaron la obtención de imágenes de TC secuencial para evaluar la rápida resolución de linfadenopatía generalizada resistente a quimioterapia. Las masas axilares bilaterales se resolvieron 83 días (UPN 01) y 31 días (UPN 03) después de la infusión, tal como indican las flechas y el círculo.

La figura 4, que comprende las figuras 4A a 4C, es una serie de imágenes que ilustran los recuentos absolutos de linfocitos y el total de células CART19⁺ en circulación para UPN 01, 02 y 03. El número total de linfocitos (total de células normales y de LLC) vs. células CART19⁺ totales en circulación se representa gráficamente para los 3 sujetos utilizando el recuento absoluto de linfocitos de valores de CBC y suponiendo un volumen de sangre de 5,0 l. El número total de células CART19 en circulación se calculó mediante la utilización de los valores de CBC en tándem con recuentos absolutos de linfocitos y los valores de marcado de Q-PCR tal como se ilustra en la figura 1, convirtiendo las copias/μg de ADN en % medio marcado, tal como se indica en otros sitios de la presente memoria. El % de marcado de Q-PCR se encontró que estaba estrechamente correlacionado (variación <2 veces) con la caracterización de citometría de flujo de los productos de infusión y con los datos de muestras de las que se encuentran disponibles datos concomitantes de citometría de flujo para enumerar directamente las células CART19 mediante tinción.

La figura 5 comprende las figuras 5A a 5D es una serie de imágenes que ilustran experimentos que implican la detección *ex vivo* directa de células positivas para CART19 en PBMC de UPN-01 71 días después de la infusión de las células T. Las PBMC de UPN-01 recogidas inmediatamente después de la aféresis el día 71 después de la infusión, o congeladas en el momento de la aféresis para la preparación del producto (línea base) de las células T y descongeladas viablemente antes de la tinción, se sometieron a análisis de citometría de flujo para detectar la presencia de células CART19 que expresaban la fracción CAR19 sobre la superficie. Con el fin de evaluar la expresión de CAR19 en linfocitos, las muestras se cotificaron con CD3-PE y el anticuerpo anti-idiotipo de CAR19 conjugado con Alexa-647 o se cotificaron con CD3-PE solo (FMO para CAR19). La figura 5A ilustra que se estableció un subgrupo de linfocitos inicial basado en la dispersión directa y lateral (FSC vs. SSC), seguido del acotamiento de subgrupos de células CD3⁺. La figura 5B ilustra el subgrupo de linfocitos CD3⁺; la figura 5C ilustra la tinción de idiotipo de CAR; la figura 5D ilustra FMO de idiotipo de CAR. El subgrupo positivo para CAR19 se estableció en las muestras de FMO de CAR19.

La figura 6, que comprende las figuras 6A a 6C, es una serie de imágenes que ilustra la estrategia de acotamiento en subgrupos para identificar la expresión de CART19 mediante la utilización de citometría de flujo policromática en especímenes de sangre de UPN 03. La estrategia de acotamiento en subgrupos para la figura 6C se muestra para UPN 03, muestra de día 56, y es representativa de la estrategia utilizada en la muestra de día 169 de UPN 03. La figura 6A ilustra el subgrupo primario: Negativo de descarte (CD14, CD16, LIVE/dead-Aqua), CD3-positivo. La figura 6B ilustra subgrupos secundarios: CD4-positivo, CD8-positivo. La figura 6C ilustra subgrupos terciarios: CAR19-positivo y CAR19-negativo, establecidos en muestras de FMO de CAR (paneles más a la derecha).

La figura 7 es una imagen que resume los datos demográficos y respuestas de los pacientes.

La figura 8 es una imagen que ilustra la expresión a largo plazo de CART19.

La figura 9, que comprende las figuras 9A y 9B, es una serie de imágenes que ilustra la aplasia profunda de células B.

La figura 10 es una imagen que muestra una reducción de las células plasmáticas en la totalidad de los 3 pacientes.

Descripción detallada

La presente invención se basa en parte en el inesperado resultado de que las células T que expresan un CAR anti-CD19 que incluye tanto CD3z como el dominio coestimulador 4-1BB (células CART19) persisten en el huésped de mamífero durante un periodo de tiempo prolongado. Por ejemplo, actualmente las células que expresan CAR19 en superficie se ha observado que se encuentran presentes en el huésped mamífero durante más de 21 meses después de la infusión de células T CAR19. De acuerdo con lo anterior, la presente exposición describe un método para reducir el número de células B normales en un mamífero mediante la administración en el mamífero que lo necesita de un CAR con diana en células B a fin de inducir tolerancia en el mamífero.

La exposición se refiere a composiciones y métodos para reducir el número de células B y, por lo tanto, inducir tolerancia. La presente exposición se refiere a un método de transferencia celular adoptiva de células T transducidas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR). Los CAR son moléculas que combinan especificidad basada en anticuerpos para un antígeno diana (p.ej., un antígeno de células B) con un dominio intracelular activador de receptor de células T para generar una proteína quimérica que manifiesta una actividad inmune celular específica anti-células B.

En una realización, el CAR indicado en la presente memoria comprende un dominio extracelular que presenta un dominio de reconocimiento de antígeno con diana en un antígeno de célula B, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático.

En una realización, las células T CAR indicadas en la presente memoria pueden generarse mediante la introducción de un vector lentivírico que comprende un CAR deseado. Las células T CAR indicadas en la presente memoria son capaces de replicarse *in vivo*, resultando en persistencia a largo plazo que puede conducir a una reducción sostenida del número de células B y a tolerancia.

En una realización, la exposición se refiere a la administración de una célula T modificada genéticamente que expresa un CAR con el fin de reducir eficazmente la incidencia, severidad o duración de la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), un episodio de rechazo o un trastorno linfoproliferativo post-trasplante.

Definiciones

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención. Aunque pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, en la presente memoria se describen los métodos y materiales preferentes. En la descripción y reivindicación de la presente invención, se utiliza la terminología siguiente.

También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente memoria presenta el propósito de describir realizaciones particulares únicamente, y que no pretender ser limitativa.

Los artículos "un" y "una" se utilizan en la presente memoria para referirse a uno o a más de uno (es decir, a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A título de ejemplo, "un elemento" se refiere a un elemento o a más de un elemento.

El término "aproximadamente" tal como se utiliza en la presente memoria en referencia a un valor medible, tal como una cantidad, una duración temporal y similar, pretende comprender variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, en algunos casos de $\pm 5\%$, en algunos casos de $\pm 1\%$ y en algunos casos de $\pm 0,1\%$ respecto al valor especificado, ya que dichas variaciones resultan apropiadas para llevar a cabo los métodos dados a conocer.

El término "activación" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al estado de una célula T que ha sido suficientemente estimulada para inducir proliferación celular detectable. La activación puede encontrarse asociada además a la producción inducida de citoquinas y a funciones efectoras detectables. La expresión "células T activadas" se refiere, entre otras cosas, a células T que están experimentando división celular.

El término "anticuerpo", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y pueden ser partes inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos con frecuencia son tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos en la presente invención pueden existir en una diversidad de formas, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, Fv, Fab y (F(ab)₂), así como anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos humanizados (Harlow et al., en: *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1999; Harlow et al., en: *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989; Houston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883, 1988; Bird et al., *Science* 242:423-426, 1988).

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicos de un anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos scFv y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El término "antígeno" o "Ag" tal como se utiliza en la presente memoria se define como una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Dicha respuesta inmunitaria puede implicar la producción de anticuerpos o la activación de células inmunitariamente competentes específicas, o ambas. El experto en la materia entenderá que cualquier macromolécula, incluyendo virtualmente todas las proteínas o péptidos, puede actuar de antígeno. Además, los antígenos pueden derivarse de ADN recombinante o genómico. El experto en la materia entenderá que cualquier ADN que comprenda una secuencia de nucleótidos o una secuencia parcial de nucleótidos codificante de una proteína que induce una respuesta inmunitaria codifica por lo tanto un "antígeno" tal como se utiliza este término en la presente memoria. Además, el experto en la materia entenderá que un antígeno no necesariamente está codificado únicamente por una secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen. Resulta fácilmente evidente que la presente invención incluye, aunque sin limitación, la utilización de secuencias parciales de nucleótidos de más de un gen y que dichas secuencias de nucleótidos están dispuestas en diversas combinaciones para inducir la respuesta inmunitaria deseada. Además, el experto en la materia entenderá que el antígeno no necesariamente se encuentra codificado por un "gen" en absoluto. Resulta fácilmente evidente que el antígeno puede generarse mediante síntesis o puede derivarse de una muestra biológica. Dicha muestra biológica puede incluir, aunque sin limitación, una muestra de tejido, una muestra tumoral, una célula o un fluido biológico.

El término "autoantígeno" se refiere, según la presente invención, a cualquier autoantígeno que resulte reconocido por el sistema inmunitario como foráneo. Los autoantígenos comprenden, aunque sin limitarse a ellos, proteínas celulares, fosfoproteínas, proteínas de superficie celular, lípidos celulares, ácidos nucleicos, glucoproteínas, incluyendo receptores de superficie celular.

La expresión "enfermedad autoinmunitaria" tal como se utiliza en la presente memoria se define como un trastorno que resulta de una respuesta autoinmunitaria. Una enfermedad autoinmune es el resultado de una respuesta

inapropiada y excesiva a un autoantígeno. Entre los ejemplos de enfermedades autoinmunes se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, hepatitis autoinmune, parotiditis autoinmune, enfermedad de Crohn, diabetes (tipo I), epidermolisis distrófica bullosa, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia grave, pénfigo vulgar, soriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, escleroderma, síndrome de Sjögren, espondiloartropatías, tiroiditis, vasculitis, vitiligo, mixedema, anemia perniciosa, colitis ulcerosa, entre otras.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “autólogo” pretende referirse a cualquier material derivado del mismo individuo en el que posteriormente se reintroduce.

El término “alógeno” se refiere a un injerto derivado de un animal diferente de la misma especie.

El término “xenogénico” se refiere a un injerto derivado de un animal de una especie diferente.

Un “marcador de superficie de células B” tal como se utiliza en la presente memoria es un antígeno expresado sobre la superficie de una célula B que puede ser la diana de un agente que se une a la misma. Entre los marcadores ejemplares de superficie de células B se incluyen los marcadores de superficie de leucocitos CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD37, CD53, CD72, CD73, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85 y CD86. El marcador de superficie de células B de particular interés se expresa preferentemente sobre células B en comparación con otros tejidos no de células B de un mamífero y puede expresarse tanto sobre células B precursoras como células B maduras. En una realización, el marcador preferente es CD19, que se encuentra sobre células B durante la diferenciación del linaje a partir del estado de células pro/pre-B hasta el estado de célula plasmática diferenciada terminalmente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la “reducción del número de células B” se refiere a una reducción de los niveles de células B en un animal o ser humano después del tratamiento farmacológico, celular o de anticuerpos, en comparación con el nivel antes del tratamiento. Los niveles de células B son medibles utilizando ensayos bien conocidos, tales como la obtención de un recuento sanguíneo completo, mediante tinción de análisis de FACS para marcadores conocidos de células B y mediante métodos descritos en otros sitios de la presente memoria. La reducción del número de células B puede ser parcial o completa. En una realización, la reducción del número de células B es de 25% o superior.

Los términos “reducir el número” y “reducción del número” tal como se utilizan en la presente memoria en referencia a células B y para los fines de la especificación y reivindicaciones, se refieren a uno o más de: bloqueo de la función de las células B, inactivación funcional de las células B, citólisis de las células B, inhibición de la proliferación de las células, inhibición de la diferenciación de las células B en células plasmáticas, causación de una disfunción de las células B que resulta en un beneficio terapéutico, inhibición de la producción de anticuerpos anti-antígeno desprendido, reducción del número de células B, inactivación de las células B que han sido expuestas o activadas por antígenos desprendidos, bloqueo de una o más funciones de las células B que han sido expuestas o activadas por antígenos desprendidos, citólisis de células B que han sido expuestas o activadas por antígenos desprendidos, y reducción del número de células que han sido expuestas o activadas por antígenos desprendidos. La reducción del número de células B puede ser el resultado de uno o más mecanismos, incluyendo, aunque sin limitación, inactivación clonal, apoptosis, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, citotoxicidad mediada por el complemento y una inactivación, disfunción o muerte celular mediada por ruta de señalización.

El término “cáncer” tal como se utiliza en la presente memoria se define como una enfermedad caracterizada por el crecimiento rápido e incontrolado de células aberrantes. Las células de cáncer pueden extenderse localmente o mediante el torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. Entre los ejemplos de diversos cánceres se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer ovárico, cáncer cervical, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer hepático, cáncer cerebral, linfoma, leucemia, cáncer pulmonar y similares.

El antígeno “CD19” se refiere a un antígeno de aproximadamente 90 kDa que puede identificarse mediante, por ejemplo, el anticuerpo HD237 o B4 (Kiesel et al., Leukemia Research II, 12:1119, 1987). Se observa CD19 sobre las células durante toda la diferenciación de las células de linaje B desde el estado de célula madre hasta la diferenciación terminal en células plasmáticas, incluyendo, aunque sin limitación, células pre-B, células B (incluyendo células B no expuestas, células B estimuladas por antígeno, células B de memoria, células plasmáticas y linfocitos B) y células dendríticas foliculares. CD19 también se encuentra sobre las células B en el tejido fetal humano. En realizaciones preferentes, el antígeno CD19 que es la diana de los anticuerpos de la invención es el antígeno CD19 humano.

La expresión “ligando coestimulador”, tal como se utiliza la expresión en la presente memoria, incluye una molécula sobre una célula presentadora de antígeno (p.ej., una aAPC, célula dendrítica, célula B y similar) que se une específicamente a una molécula coestimuladora afín sobre una célula T, proporcionando de esta manera una señal que, además de la señal primaria proporcionada por, por ejemplo, la unión de un complejo TCR/CD3 a una molécula de CMH cargada con péptido, media en una respuesta de células T, incluyendo, aunque sin limitación, la proliferación, activación, diferenciación y similares. Un ligando coestimulador puede incluir, aunque sin limitación, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulador inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intracelular (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor de linfotóxina beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, un agonista o anticuerpo que se une al receptor de ligando Toll y un ligando que se une específicamente a B7-H3. Un ligando coestimulador comprende, además, entre otros, un anticuerpo que se une específicamente a una molécula coestimuladora presente sobre una célula T, tal como, aunque sin limitarse a ellas, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a función linfocitaria (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y un ligando que se une específicamente a CD83.

Una “molécula coestimuladora” se refiere a la pareja de unión afín sobre una célula T que se une específicamente a un ligando coestimulador, mediando de esta manera en una respuesta coestimuladora de la célula T, tal como, aunque sin limitarse a ella, la proliferación. Entre las moléculas coestimuladoras se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, una molécula de CMH de clase I, BTLA y un receptor de ligando de tipo Toll.

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

Una “enfermedad” es un estado de salud de un animal en el que el animal no puede mantener la homeostasis y en el que, en el caso de que la enfermedad no mejore, la salud del animal continúa deteriorándose. En contraste, un “trastorno” en un animal es un estado de salud en el que el animal es capaz de mantener la homeostasis, pero en el que el estado de salud del animal es menos favorable del que sería en ausencia del trastorno. Sin tratar, un trastorno no necesariamente causa una reducción adicional del estado de salud del animal.

Una “cantidad eficaz”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico o profiláctico.

Tal como se utiliza en la presente memoria, “endógeno” se refiere a cualquier material procedente de, o producido dentro de, un organismo, célula, tejido o sistema.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “exógeno” se refiere a cualquier material introducido en un organismo, célula, tejido o sistema que ha sido producido fuera del organismo, célula, tejido o sistema.

El término “expresión” tal como se utiliza en la presente memoria se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia particular de nucleótidos controlada por su promotor.

“Vector de expresión” se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de la expresión operablemente ligadas a una secuencia de nucleótidos que debe expresarse.

Un vector de expresión comprende suficientes elementos de acción en cis para la expresión; la célula huésped puede suministrar otros elementos para la expresión o suministrarse en un sistema de expresión *in vitro*. Entre los vectores de expresión se incluyen los conocidos de la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (p.ej., desnudos o contenidos en liposomas) y virus (p.ej., lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.

El término “homólogo” se refiere a la similitud de las secuencias o la identidad de las secuencias entre dos polipéptidos o entre dos moléculas de ácidos nucleicos. En el caso de que una posición en las dos secuencias comparadas esté ocupada por la misma base o la misma subunidad monomérica de aminoácido, p.ej., en el caso de que una posición en cada una de las dos moléculas de ADN se encuentre ocupada por adenina, las moléculas serán homólogas en esa posición. El porcentaje de homología entre dos secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartido por las dos secuencias, dividido por el número de posiciones comparadas X 100. Por ejemplo, en el caso de que 6 de 10 posiciones en dos secuencias sean coincidentes u homólogas, las dos secuencias son 60% homólogas. A título de ejemplo, las secuencias de ADN ATTGCC y TATGGC comparten una homóloga de 50%. Generalmente, se realiza una comparación una vez las dos secuencias han sido alineadas para proporcionar la máxima homología.

El término “inmunoglobulina” o “Ig”, tal como se utiliza en la presente memoria, se define como una clase de proteínas que funciona como anticuerpos. Los anticuerpos expresados por las células B en ocasiones se denominadas BCR (por sus siglas en inglés, receptor de células B) o receptor de antígeno. Los cinco elementos incluidos en dicha clase de proteínas son IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. IgA es el anticuerpo primario que se encuentra presente en secreciones corporales, tales como saliva, lágrimas, leche materna, secreciones gastrointestinales y secreciones mucosas de los tractos respiratorio y genitourinario. IgG es el anticuerpo circulante más común. IgM es la inmunoglobulina principal producida en la respuesta inmunitaria primaria en la mayoría de sujetos. Es la inmunoglobulina más eficiente en aglutinación, fijación del complemento y otras respuestas de anticuerpos, y resulta importante en la defensa contra bacterias y virus. IgD es la inmunoglobulina que no presenta ninguna función de anticuerpo conocida, aunque podría servir de receptor de antígeno. IgE es la inmunoglobulina que media en la hipersensibilidad inmediata causando la liberación de mediadores procedentes de mastocitos y basófilos tras la exposición a un alérgeno.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “respuesta inmunitaria” incluye las respuestas inmunitarias mediadas por células T y/o mediadas por células B. Entre las respuestas inmunitarias ejemplares se incluyen las respuestas de células T, p.ej., la producción de citoquinas y la citotoxicidad celular. Además, la expresión respuesta inmunitaria incluye respuestas inmunitarias que son realizadas indirectamente por la activación de las células T, p.ej., la producción de anticuerpos (respuestas humorales) y la activación de células sensibles a citoquinas, p.ej., macrófagos. Entre las células inmunitarias implicadas en la respuesta inmunitaria se incluyen linfocitos, tales como células B y células T (células CD4⁺, CD8⁺, Th1 y Th2), células presentadoras de antígenos (p.ej., células presentadoras de antígenos profesionales, tales como células dendríticas, macrófagos, linfocitos B, células de Langerhans y células presentadoras de antígenos no profesionales, tales como queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos y oligodendrocitos), células asesinas naturales, células mieloides, tales como macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “tolerancia inmunitaria” se refiere a métodos realizados en una proporción de los sujetos tratados en comparación con sujetos no tratados, en los que se produce: a) un nivel reducido de una respuesta inmunitaria específica (que se cree está mediada por lo menos en parte por linfocitos T efectoras específicos de antígeno, linfocitos B, anticuerpos o sus equivalentes), b) un retardo en la aparición o progresión de una respuesta inmunitaria específica, o c) un riesgo menor de aparición o progresión de

una respuesta inmunitaria específica. Ocurre tolerancia inmunitaria “específica” en el caso de que la tolerancia inmunitaria se induzca preferentemente contra determinados antígenos y no otros.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un “material didáctico” incluye una publicación, una grabación, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que pueda utilizarse para comunicar la utilidad de las composiciones y métodos de la invención. El material didáctico del kit de la invención puede, por ejemplo, fijarse a un recipiente que contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición de la invención o enviarse junto con un recipiente que contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición. Alternativamente, el material didáctico puede enviarse por separado del recipiente con la intención de que el material didáctico y los compuestos sean utilizados conjuntamente por el receptor.

El término “aislado” se refiere a alterado o separado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido naturalmente presente en un animal vivo no se encuentra “aislado”, aunque el mismo ácido nucleico o péptido parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de estado natural se encuentra “aislado”. Un ácido nucleico o proteína aislado puede existir en forma sustancialmente purificada, o puede existir en un medio no nativo, tal como, por ejemplo, una célula huésped.

Un “lentivirus” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un género de la familia *Retroviridae*. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus en que son capaces de infectar las células que no están en división; puede insertarse una cantidad significativa de información genética en el ADN de la célula huésped, por lo que es uno de los métodos más eficientes de vector de inserción génica. VIH, VIS y VIF son todos ejemplos de lentivirus. Los vectores derivados de lentivirus ofrecen los medios de conseguir niveles significativos de transferencia génica *in vivo*.

El término “modulación”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a mediar en un incremento o reducción detectable del nivel de una respuesta en un sujeto en comparación con el nivel de respuesta en el sujeto en ausencia de un tratamiento o compuesto, y/o en comparación con el nivel de una respuesta en un sujeto de otro modo idéntico, aunque no tratado. El término comprende perturbar y/o afectar a una señal o respuesta nativa, mediando de esta manera en una respuesta terapéutica beneficiosa en un sujeto, preferentemente un ser humano. La administración “parenteral” de una composición inmunogénica incluye, p.ej., las técnicas de inyección subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) o intraesternal, o de infusión.

Los términos “paciente”, “sujeto”, “individuo” y similares se utilizan intercambiabilmente en la presente memoria, y se refieren a cualquier animal, o células del mismo, sea *in vitro* o *in situ*, en las que pueden aplicarse los métodos indicados en la presente memoria. En determinadas realizaciones no limitativas, el paciente, sujeto o individuo es un ser humano.

El término “rechazo” se refiere a un estado en el que el órgano o tejido trasplantado no resulta aceptado por el cuerpo del receptor. El rechazo resulta de que el sistema inmunitario del receptor ataca el órgano o tejido trasplantado. El rechazo puede producirse días a semanas después del trasplante (agudo) o meses a años después del trasplante (crónico).

La expresión “se une específicamente” tal como se utiliza en la presente memoria con respecto a un anticuerpo se refiere a un anticuerpo que reconoce un antígeno específico, aunque no reconoce o se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de una especie puede unirse además al antígeno de una o más especies. Sin embargo, dicha reactividad cruzada entre especies por sí misma no altera la clasificación de un anticuerpo como específico. En otro ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno también puede unirse a diferentes formas alélicas del antígeno. Sin embargo, dicha reactividad cruzada entre especies por sí misma no altera la clasificación de un anticuerpo como específico. En algunos casos, la expresión “unión específica” o “que se une específicamente” puede utilizarse en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido a una segunda especie química, refiriéndose a que la interacción es dependiente de la presencia de una estructura particular (p.ej., un determinante antigénico o epítipo) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica y no a las proteínas en general. En el caso de que un anticuerpo sea específico para el epítipo “A”, la presencia de una molécula que contiene epítipo A (o A no marcado, libre) en una reacción que contiene “A” marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado que está unido al anticuerpo.

El término “estimulación” se refiere a una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimuladora (p.ej., un complejo TCR/CD3) con su ligando afín, mediando de esta manera en un suceso de transducción de señales, tal como, aunque sin limitación, una transducción de señal mediante el complejo TCR/CD3. La estimulación puede mediar en la expresión alterada de determinadas moléculas, tal como la regulación negativa de TGF- β , y/o la reorganización de estructuras citoesqueléticas, y similares.

Una “molécula estimuladora”, tal como se utiliza la expresión en la presente memoria, se refiere a una molécula en una célula T que se une específicamente a un ligando estimulador afín presente sobre una célula presentadora de antígeno.

Un “ligando estimulador”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un ligando que, en el caso de encontrarse presente sobre una célula presentadora de antígeno (p.ej., una aAPC, una célula dendrítica, una célula B y similar) puede unirse específicamente a una pareja de unión afín (a la que se hace referencia en la presente memoria como “molécula estimuladora”) sobre una célula T, mediando de esta manera en una respuesta primaria por la célula T, incluyendo, aunque sin limitación, la activación, el inicio de una respuesta inmunitaria, la proliferación y similares. Los ligandos estimuladores son bien conocidos de la técnica y comprenden, entre otros, una molécula de CMH de clase I cargada con un péptido, un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD28 superagonista y un anticuerpo anti-CD2 superagonista.

El término “sujeto” pretende incluir organismos vivos en los que puede inducirse una respuesta inmunitaria (p.ej., mamíferos). Entre los ejemplos de sujetos se incluyen seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de los mismos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una célula “sustancialmente purificada” es una célula que se encuentra esencialmente libre de otros tipos celulares. Una célula sustancialmente purificada se refiere además a una célula que ha sido separada de otros tipos celulares con los que se encuentra asociada normalmente en su estado natural. En algunos casos, una población de células sustancialmente purificada se refiere a una población homogénea de células. En otros casos, dicha expresión se refiere simplemente a una célula que ha sido separada de otras células con las que se encuentra naturalmente asociada en su estado natural. En algunas realizaciones, las células se cultivan *in vitro*. En otras realizaciones, las células no se cultivan *in vitro*.

El término “terapéutico” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un tratamiento y/o a la profilaxis. Se obtiene un efecto terapéutico mediante supresión, remisión o erradicación de un estado de enfermedad.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad del compuesto de la invención que inducirá la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema o sujeto que busca el investigador, veterinario, médico u otro responsable clínico. La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” pretende incluir la cantidad de un compuesto que, tras su administración, resulta suficiente para evitar el desarrollo, o el alivio en cierto grado, de uno o más de los síntomas del trastorno o enfermedad bajo tratamiento. La cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del compuesto, la enfermedad y su gravedad y la edad, peso, etc. del mamífero que debe tratarse.

Un “trasplante”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a células, tejidos o un órgano que se introduce en un individuo. La fuente del material trasplantado pueden ser células en cultivo, células de otro individuo o células del mismo individuo (p.ej., después del cultivo de las células *in vitro*). Son trasplantes de órganos ejemplares, los de riñón, hígado, corazón, pulmón y páncreas.

El “tratamiento” de una enfermedad tal como se utiliza el término en la presente memoria se refiere a reducir la frecuencia o severidad de por lo menos un signo o síntoma de una enfermedad o trastorno experimentado por un sujeto.

El término “transfectado” o “transformado” o “transducido” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un proceso por el que ácido nucleico exógeno se transfiere o se introduce 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 del sujeto primaria y su progenie.

El término “tolerante” se refiere a un individuo con una respuesta inmunitaria reducida o ausente a un antígeno específico o grupo de antígenos. En el contexto de la invención, se considera que un individuo es tolerante en el caso de que no rechace (es decir, no genere una respuesta inmunitaria significativa contra) las células trasplantadas. En algunos casos, el individuo tolerante no rechaza las células trasplantadas, incluso en ausencia de terapia inmunosupresora. En el contexto de la invención, se considera que un individuo es “no tolerante” en el caso de que el individuo rechace las células trasplantadas. Entre los individuos no tolerantes se incluyen aquellos en los que el rechazo se controla utilizando terapia inmunosupresora (p.ej., inmunosupresión estándar), así como aquellos que experimentan una respuesta inmunitaria activa contra las células trasplantadas.

Tal como se utiliza en la presente memoria, “tolerancia *in vivo*” se refiere a la falta sustancial de respuesta inmunitaria específica para el tejido foráneo. La respuesta inmunitaria puede partir del sujeto receptor que genera una respuesta inmunitaria a un tejido foráneo o, a la inversa, la respuesta inmunitaria puede partir de que el tejido foráneo genere una respuesta inmunitaria contra el sujeto receptor (p.ej., la EICH). Los métodos de medición de la tolerancia *in vivo* son comúnmente conocidos de la técnica.

Intervalos: en toda la presente exposición, los diversos aspectos de la invención pueden presentarse en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo se proporciona meramente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. De acuerdo con lo anterior, la descripción de un intervalo debe considerarse que ha dado a conocer específicamente todos los posibles subintervalos, así como los valores numéricos individuos dentro de ese intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo, tal como de 1 a 6, debe considerarse que ha dado a conocer específicamente subintervalos tales como 1 a 3, 1 a 4, 1 a 5, 2 a 4, 2 a 6, 3 a 6, etc., así como los números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4,5, 5,3 y 6. Lo anterior se aplica con independencia de la amplitud del intervalo.

Descripción

La presente exposición describe composiciones y métodos para reducir el número normal de células B en un mamífero. En una realización, la reducción del número de células B utilizando el CAR de la invención induce tolerancia en el mamífero.

En una realización, la presente exposición proporciona un método de inducción de tolerancia *in vivo* al tejido foráneo trasplantado. En algunas realizaciones, el método puede utilizarse, en parte, para prevenir y/o tratar el rechazo de un tejido trasplantado. En términos generales, el método comprende administrar una célula T CAR de la invención en un sujeto expuesto a tejido foráneo trasplantado. La expresión “tejido foráneo”, tal como se utiliza en la presente memoria, puede comprender un trasplante de médula ósea, un trasplante de órgano, una transfusión de sangre, o cualquier otro tejido o célula foráneo que se introduzca deliberadamente en un sujeto.

En otra realización, el método puede utilizarse, en parte, para prevenir y/o tratar la enfermedad del injerto contra el

huésped (EICH). En términos generales, el método comprende administrar una célula T CAR de la invención en un sujeto expuesto a tejido foráneo trasplantado. La expresión "tejido foráneo", tal como se utiliza en la presente memoria, puede comprender un trasplante de médula ósea, un trasplante de órgano, una transfusión de sangre, o cualquier otro tejido o célula foráneo que se introduzca deliberadamente en un sujeto.

5 En una realización, el CAR indicado en la presente memoria puede manipularse para comprender un dominio extracelular que presenta un dominio de unión a antígeno con diana en un antígeno de célula B fusionado con un dominio de señalización intracelular de la cadena zeta del complejo de receptor de antígeno de célula T (p.ej., CD3 zeta). Un antígeno de célula B ejemplar es CD19 debido a que este antígeno se expresa sobre las células B malignas. Sin embargo, la exposición no se encuentra limitada a la utilización de CD19 como diana. Por el contrario, la exposición incluye cualquier fracción de unión a antígeno de célula B que se une a su antígeno afin. La fracción de unión a antígeno preferentemente se fusiona con un dominio intracelular de una o más de una molécula coestimuladora y una cadena zeta. Preferentemente, la fracción de unión a antígeno se fusiona con uno o más dominios intracelulares seleccionados del grupo de un dominio de señalización de CD137 (4-1BB), un dominio de señalización CD28, un dominio de señalización CD3zeta y cualquier combinación de los mismos.

20 En una realización, el CAR indicado en la presente memoria comprende un dominio de señalización CD137 (4-1BB). Lo anterior se debe a que la presente invención se basa en parte en el resultado de que las respuestas de células T mediadas por CAR pueden potenciarse adicionalmente con la adición de dominios coestimuladores. Por ejemplo, la inclusión del dominio de señalización CD137 (4-1BB) incrementó significativamente la actividad mediada por CAR y la persistencia *in vivo* de las células T CAR en comparación con células T CAR de otro modo idénticas no manipuladas para expresar CD137 (4-1BB). Sin embargo, la exposición no se encuentra limitada a un CAR específico. Por el contrario, puede utilizarse cualquier CAR con diana en una célula B en la presente invención. Las composiciones y métodos de generación de CAR han sido descritos en el documento nº WO 2012/079000.

25 Métodos

30 La exposición se refiere a métodos de utilización del CAR y células T CAR indicadas en la presente memoria para reducir el número de células B y estimular la tolerancia. En una realización, el método incluye estimular la tolerancia al trasplante (p.ej., de trasplantes de órgano o tejido) en un paciente. En otra realización, el método incluye la prevención y/o el tratamiento de la EICH. En una realización específica, el CAR indicado en la presente memoria presenta como diana CD19 sobre las células B.

35 En una realización, la capacidad de inducir tolerancia humoral sostenida en el donante es clave para conseguir una tolerancia robusta al trasplante y/o para prevenir o tratar la EICH. La exposición comprende la utilización de las células T CAR indicadas en la presente memoria para reducir el número de células B y para inducir tolerancia mediante la administración de las células T CAR en un animal, preferentemente un mamífero, y más preferentemente un paciente humano para el tratamiento de una o más enfermedades, trastornos, síntomas o condiciones asociadas al trasplante de un órgano o tejido (p.ej., rechazo del trasplante, EICH y/o condiciones asociadas al mismo).

40 El rechazo de órgano se produce por la destrucción celular inmunitaria del huésped del tejido trasplantado mediante una respuesta inmunitaria. De manera similar, una respuesta inmunitaria también está implicada en la EICH aunque, en este caso, las células inmunitarias trasplantadas foráneas destruyen los tejidos del huésped. Por ejemplo, el rechazo del órgano y/o EICH puede producirse después del trasplante de corazón, válvula cardíaca, pulmón, riñón, hígado, páncreas, intestino, piel, vasos sanguíneos, médula ósea, células madre, células óseas o células de los islotes. Sin embargo, la invención no se encuentra limitada a un tipo específico de trasplante. A título de ejemplo no limitativo, puede llevarse a cabo un trasplante de células de los islotes para prevenir la aparición de diabetes o como tratamiento de la diabetes. La administración de las células T CAR indicadas en la presente memoria que inhibe una respuesta inmunitaria, particularmente la proliferación, diferenciación o supervivencia de las células B, es una terapia eficaz en la prevención del rechazo de órganos y/o tejidos o la EICH. La administración de las células T CAR indicada en la presente memoria también puede utilizarse para estimular la tolerancia al trasplante tras el trasplante de un órgano y/o tejido.

55 Las células T CAR indicadas en la presente memoria también pueden utilizarse para estimular la tolerancia al trasplante; para tratar, reducir, inhibir y/o prevenir el rechazo de trasplantes de órgano y/o tejido, y/o para reducir el título de anticuerpos en un paciente que ha recibido un trasplante de órgano o tejido. En una realización, las células T CAR indicadas en la presente memoria pueden utilizarse para estimular la tolerancia al trasplante en un paciente mediante la administración en el paciente de una cantidad eficaz de las células T CAR indicadas en la presente memoria, previniendo o retrasando de esta manera el rechazo del trasplante. En otra realización, las células T CAR indicadas en la presente memoria pueden utilizarse para tratar el rechazo de órgano o trasplante en un paciente mediante la administración en el mismo de una cantidad eficaz de las células T CAR indicadas en la presente memoria, inhibiendo de esta manera el rechazo del órgano o tejido trasplantado. En todavía otra realización, las células T CAR indicadas en la presente memoria pueden utilizarse para reducir el título de anticuerpos en un paciente que ha recibido, o que recibirá, un trasplante de órgano o tejido mediante la administración en el paciente de una cantidad eficaz de las células T CAR indicadas en la presente memoria, reduciendo de esta manera el título de anticuerpos.

- 5 En una realización, la exposición proporciona un método de estimulación de la tolerancia al trasplante en un paciente, que comprende administrar en el paciente una cantidad eficaz de las células T CAR indicadas en la presente memoria, retrasando de esta manera el rechazo del trasplante en el paciente.
- 10 En otra realización, la exposición proporciona un método de tratamiento del rechazo de órgano o trasplante en un paciente que comprende la administración en el mismo de una cantidad eficaz de las células T CAR indicadas en la presente memoria, inhibiendo de esta manera el rechazo del órgano o tejido trasplantado.
- 15 En otra realización, la exposición proporciona un método de reducción del título de anticuerpos en un paciente que ha recibido, o que recibirá, un trasplante de órgano o tejido que comprende la administración en el paciente de una cantidad eficaz de las células T CAR indicadas en la presente memoria, reduciendo de esta manera el título de anticuerpos en el paciente.
- 20 En una realización, la exposición proporciona un método de inhibición o reducción de la producción de inmunoglobulinas en un paciente, que comprende administrar en el paciente una cantidad eficaz de las células T CAR indicadas en la presente memoria.
- 25 En una realización, las células T CAR indicadas en la presente memoria reducen o inhiben la función de las células B. En otra realización, las células T CAR indicadas en la presente memoria reducir el número o eliminan las células B del sujeto. Por ejemplo, las células T CAR indicadas en la presente memoria puede manipularse para que presenten como diana un antígeno de superficie de las células B a fin de permitir que las células T muestren funciones efectoras contra la célula B.
- 30 Terapia para la inhibición de respuestas inmunitarias adversas tras el trasplante
- La presente invención incluye utilizar células T CAR indicadas en la presente memoria como terapia para inhibir la EICH o el rechazo del injerto tras el trasplante. De acuerdo con lo anterior, la presente exposición comprende un método de puesta en contacto de un trasplante del donante, por ejemplo una malla biocompatible o un tejido, órgano o célula del donante, con células T CAR indicadas en la presente memoria antes, concurrentemente o después del trasplante del trasplante en un receptor. Las células T CAR indicadas en la presente memoria sirven para mejorar, inhibir o reducir una respuesta adversa por el trasplante del donante contra el receptor, previniendo o tratando de esta manera la EICH.
- 35 Tal como se ha comentado en otros sitios de la presente memoria, las células T pueden obtenerse de cualquier fuente, por ejemplo del donante de tejido, del receptor del trasplante o, alternativamente, de una fuente no relacionada (un individuo diferente o un incluso una especie diferente) para la generación de células T CAR indicadas en la presente memoria para la utilización en la eliminación o la reducción de una respuesta inmunitaria no deseada por un trasplante contra un receptor del trasplante. De acuerdo con lo anterior, las células T CAR indicadas en la presente memoria pueden ser autólogas, alogénicas o xenogénicas respecto al donante de tejido, al receptor del trasplante o, alternativamente, una fuente no relacionada.
- 40 En una realización de la presente exposición, el trasplante se expone a las células T CAR indicadas en la presente memoria antes, simultáneamente o después del trasplante del trasplante en el receptor. En dicha situación, una respuesta inmunitaria contra el trasplante causada por cualesquiera células alorreactivas del receptor podría suprimirse con las células T CAR indicadas en la presente memoria en el trasplante debido a que las células T CAR pueden reducir el número de células B e inducir tolerancia.
- 45 En otra realización de la presente exposición, el trasplante del donante puede “preacondicionarse” o “pretratarse” mediante tratamiento del trasplante antes del trasplante en el receptor a fin de reducir la inmunogenicidad del trasplante contra el receptor, reduciendo y/o previniendo de esta manera la EICH o el rechazo del trasplante. El trasplante puede ponerse en contacto con células o un tejido del receptor antes del trasplante a fin de activar las células T que pueden estar asociadas al trasplante. Tras el tratamiento del trasplante con células o un tejido del receptor, las células o tejido pueden ser eliminadas del trasplante. El trasplante tratado seguidamente se pone en contacto adicionalmente con células T CAR indicadas en la presente memoria a fin de reducir, inhibir o eliminar la actividad de las células T y/o B que resultaron activadas por el tratamiento de las células o tejido del receptor. Tras dicho tratamiento del trasplante con células T CAR indicadas en la presente memoria, las células T CAR pueden eliminarse del trasplante antes del trasplante en el receptor. Sin embargo, algunas células T CAR pueden adherirse al trasplante y, por lo tanto, pueden introducirse en el receptor con el trasplante. En dicha situación, las células T CAR introducidas en el receptor pueden suprimir una respuesta inmunitaria contra el receptor causada por cualquier célula asociada al trasplante. Sin restringirse a ninguna teoría en particular, el tratamiento del trasplante con células T CAR antes del trasplante del trasplante en el receptor sirve para reducir, inhibir o eliminar la actividad de las células T y/o B activadas, previniendo de esta manera la reestimulación o induciendo la hipersensibilidad de las células T y/o B a la posterior estimulación antigénica por un tejido y/o células del receptor. El experto en la materia entenderá, basándose en la presente exposición, que el preacondicionado o pretratamiento del trasplante antes del trasplante puede reducirse o eliminar la respuesta del injerto contra el huésped.
- 50
- 55
- 60
- 65

Aplicación terapéutica

- 5 En una realización, la presente exposición incluye un tipo de terapia celular en la que las células T se modifican genéticamente para expresar un CAR y las células T CAR se infusionan en un receptor que las necesita. La célula infundada es capaz de eliminar una célula diana. En una realización, la célula diana es una célula B. Al contrario que las terapias de anticuerpos, las células T CAR son capaces de replicarse *in vivo*, resultando en persistencia a largo plazo que puede conducir a una reducción sostenida del número de células B y a tolerancia.
- 10 En una realización, las células T CAR indicadas en la presente memoria pueden experimentar una robusta expansión *in vivo* de las células T y pueden persistir durante un periodo de tiempo prolongado. En otra realización, las células T CAR indicadas en la presente memoria se convierten en células T de memoria específicas que pueden reactivarse para inhibir la proliferación de las células B. Por ejemplo, una célula CART19 induce una respuesta inmunitaria específica contra células que expresan CD19.
- 15 Las células T modificadas con CAR Indicadas en la presente memoria también pueden servir como un tipo de vacuna para la inmunización *ex vivo* y/o la terapia *in vivo* en un mamífero. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.
- 20 Con respecto a la inmunización *ex vivo*, se produce por lo menos uno de los siguientes *in vitro* antes de la administración de la célula en un mamífero: i) expansión de las células, ii) introducción de un ácido nucleico codificante de un CAR en las células y/o iii) crioconservación de las células.
- 25 Los procedimientos *ex vivo* son bien conocidos de la técnica y se comentan más completamente después. Brevemente, se aíslan células de un mamífero (preferentemente un ser humano) y se modifican genéticamente (es decir, se transducir o se transfectan *in vitro*) con un vector que expresa un CAR dado a conocer en la presente memoria. Las células modificadas con CAR pueden administrarse en el 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.
- 30 Además de utilizar una vacuna a base de células en términos de inmunización *ex vivo*, la presente exposición proporciona además composiciones y métodos para la inmunización *in vivo* a fin de inducir una respuesta inmunitaria dirigida contra un antígeno de célula B en un paciente.
- 35 Generalmente, las células activadas y expandidas tal como se indica en la presente memoria pueden utilizarse en la reducción del número de células B y la inducción de tolerancia. En particular, las células T modificadas con CAR indicadas en la presente memoria se utilizan en el tratamiento de una o más enfermedades, trastornos, síntomas o condiciones asociadas al trasplante de órgano o tejido (p.ej., EICH y/o condiciones asociadas a la misma). De esta manera, la presente exposición proporciona métodos para el tratamiento o la prevención del rechazo de órgano y la
- 40 EICH, que comprende administrar en un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de las células T modificadas con CAR indicadas en la presente memoria.
- 45 En una realización, las células T CAR indicadas en la presente memoria se administran junto con un agente inmunosupresor. Puede utilizarse cualquier agente inmunosupresor conocido de la técnica. Por ejemplo, el agente inmunosupresor puede ser ciclosporina, azatioprina, rapamicina, micofenolato mofetilo, ácido micofenólico, prednisona, sirolimus, basiliximab o daclizumab, o cualquier combinación de los mismos. Entre los inmunosupresores específicos adicionales que pueden utilizarse se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, ORTHOCLONE OKT™ 3 (muromonab-CD3), SANDIMMUNE™, NEORAL™, SANGDYA™ (ciclosporina), PROGRAF™ (FK506, tacrolimus), CELLCEPT™ (micofenolato mofetilo, del que el metabolito activo es el ácido micofenólico), IMURAN™ (azatioprina),
- 50 glucorticoesteroides, estereoides adrenocorticales, tales como DELTASONE™ (prednisona) y HYDELTRASOL™ (prednisolona), FOLEX™ y MEXATE™ (metotrexato), OXSORALEN-ULTRA™ (metoxsalén), RITUXAN™ (rituximab) y RAPAMUNE™ (sirolimus).
- 55 Las células T CAR indicadas en la presente memoria pueden administrarse en el paciente antes, después o concomitantemente con el agente inmunosupresor. Por ejemplo, las células T CAR indicadas en la presente memoria pueden administrarse después de administrar el agente inmunosupresor en el paciente o las células T CAR indicadas en la presente memoria pueden administrarse antes de que el agente inmunosupresor se administre en el paciente. Alternativamente, o adicionalmente, las células T CAR indicadas en la presente memoria se administran simultáneamente a la administración del agente inmunosupresor en el paciente.
- 60 Las células T CAR indicadas en la presente memoria y/o el agente inmunosupresor pueden administrarse en el paciente después del trasplante. Alternativamente, o adicionalmente, las células T CAR indicadas en la presente memoria y/o el agente inmunosupresor pueden administrarse en el paciente antes del trasplante. Las células T CAR indicadas en la presente memoria y/o el agente inmunosupresor también pueden administrarse en el paciente durante
- 65 la cirugía del trasplante.

En algunas realizaciones, el método indicado en la presente memoria de administración de las células T CAR en el paciente se lleva a cabo una vez se ha iniciado la terapia inmunosupresora. En algunas realizaciones, el método se lleva a cabo más de una vez, p.ej., para monitorizar el receptor del trasplante durante el tiempo y, en caso aplicable, en diferentes regímenes de terapia inmunosupresora. En algunas realizaciones, la terapia inmunosupresora se reduce en el caso de que se prediga que el receptor del trasplante sea tolerante del trasplante. En algunas realizaciones, no se prescribe ninguna terapia inmunosupresora, p.ej., se detiene la terapia inmunosupresora, en el caso de que el receptor del trasplante se prediga que es tolerante al trasplante. En el caso de que el receptor del trasplante muestre una firma de biomarcadores no tolerante, puede restaurarse o continuarse la terapia inmunosupresora a un nivel estándar.

El trasplante de órgano o tejido puede ser de un corazón, válvula cardíaca, pulmón, riñón, hígado, páncreas, intestino, piel, vasos sanguíneos, médula ósea, células madre, hueso o células de los islotes.

Las células T CAR indicadas en la presente memoria pueden administrarse tras un diagnóstico de rechazo del órgano o tejido trasplantado, seguido de dosis tanto de células T CAR indicadas en la presente memoria como de un agente inmunosupresor, hasta que los síntomas de rechazo de órgano o tejido desaparezcan.

En algunas realizaciones, las células T CAR indicadas en la presente memoria se administran tras el diagnóstico de título incrementado de anticuerpos, seguido de dosis de tanto las células T CAR indicadas en la presente memoria como del agente inmunosupresor, hasta reducir el título de anticuerpos.

Preferentemente, el tratamiento con las células T CAR indicadas en la presente memoria se lleva a cabo mediante la administración de una cantidad eficaz de células T CAR indicadas en la presente memoria en el paciente.

Las células T CAR indicadas en la presente memoria pueden administrarse solas o en forma de una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes, tales como IL-2 u otras citoquinas o poblaciones celulares. Brevemente, las composiciones farmacéuticas indicadas en la presente memoria pueden comprender una población celular diana tal como se indica en la presente memoria, 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, y manitol; proteínas o aminoácidos, tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes, tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (p.ej., hidróxido de aluminio), y conservantes. Las composiciones indicadas en la presente memoria preferentemente se formulan para la administración intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas indicadas en la presente memoria pueden administrarse de una manera apropiada a la enfermedad que debe tratarse (o prevenirse). La cantidad y frecuencia de administración vendrá determinada por factores tales como la condición del paciente, y el tipo y severidad de la enfermedad del paciente, aunque pueden determinarse las dosis apropiadas mediante ensayos clínicos.

En donde se indica "cantidad eficaz", la cantidad precisa de las composiciones indicadas en la presente memoria que se administran puede ser determinada por el médico considerando las diferencias individuales de edad, peso, título de anticuerpos y condición del paciente (sujeto). Puede indicarse generalmente que una composición farmacéutica que comprende las células T indicadas en la presente memoria puede administrarse a una dosis de entre 10^4 y 10^9 células/kg de peso corporal, preferentemente de entre 10^5 y 10^6 células/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores enteros dentro de dichos intervalos. Las composiciones de células T también pueden administrarse múltiples veces a dichas dosis. Las células pueden administrarse mediante la utilización de técnicas de infusión que son conocidas comúnmente en la inmunoterapia (ver, p.ej., Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988). La dosis y régimen de tratamiento óptimos para el paciente particular pueden ser fácilmente determinados por el experto en medicina mediante la monitorización del paciente para signos de enfermedad y el ajuste del tratamiento de acuerdo con ellos.

En determinadas realizaciones, puede desearse la administración de células T activadas en un sujeto, seguido de la nueva extracción de sangre (o la realización de una aféresis), la activación de células T de la misma según la presente invención, y la reinfusión del paciente con dichas células T activadas y expandidas. Dicho procedimiento puede llevarse a cabo múltiples veces cada pocas semanas. En determinadas realizaciones, las células T pueden activarse a partir de extracciones de sangre de entre 10 cm^3 y 400 cm^3 . En determinadas realizaciones, las células T se activan a partir de extracciones de 20 cm^3 , 30 cm^3 , 40 cm^3 , 50 cm^3 , 60 cm^3 , 70 cm^3 , 80 cm^3 , 90 cm^3 o 100 cm^3 de sangre. Sin respaldo teórico, la utilización de dicho protocolo de múltiples extracciones de sangre/múltiples reinfusiones puede servir para seleccionar determinadas poblaciones de células T.

La administración de las composiciones de la invención puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, incluyendo mediante la inhalación de aerosol, la inyección, la ingestión, la transfusión, la implantación o el trasplante. Las composiciones indicadas en la presente memoria pueden administrarse en el paciente por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, inyección intravenosa (i.v.) o por vía intraperitoneal.

En una realización, las composiciones de células T indicadas en la presente memoria se administran en el paciente mediante inyección intradérmica o subcutánea. En otra realización, las composiciones de células T indicadas en la presente memoria se administran preferentemente mediante inyección i.v. Las composiciones de células T pueden inyectarse directamente en un tumor, ganglio linfático o sitio de infección.

En determinadas realizaciones indicadas en la presente memoria, las células se activan y expanden utilizando métodos indicados en la presente memoria, u otros métodos conocidos de la técnica en los que las células T se expanden hasta niveles terapéuticos, se administran en el paciente junto con (p.ej., antes, simultáneamente o después) cualesquiera modalidades de tratamiento relevantes, incluyendo, aunque sin limitación, el tratamiento con agentes tales como la terapia antivírica, el ciclofovir y la interleuquina-2, la citarabina (también conocida como ARA-C) o el tratamiento de natalizumab para pacientes de EM o el tratamiento de efilizumab para los pacientes de soriasis u otros tratamientos para los pacientes de LMP. En realizaciones adicionales, las células T indicadas en la presente memoria pueden utilizarse en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y anticuerpos FK506, u otros agentes inmunosupresores, tales como CAM, PATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias de anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citoquinas y radiación. Dichos fármacos inhiben la fosfatasa calcineurina dependiente del calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la p7026 quinasa, que resulta importante para la señalización inducida por factor de crecimiento (rapamicina) (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). En una realización adicional, las composiciones celulares indicadas en la presente memoria se administran en el paciente junto con (p.ej., antes, simultáneamente o después) del trasplante de médula ósea, la terapia ablativa de células T utilizando agentes quimioterapéuticos, tales como fludarabina, terapia de radiación de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos, tales como OKT3 o CAMPATH. En otra realización, las composiciones celulares indicadas en la presente memoria se administran tras la terapia ablativa de células B, tales como agentes que reaccionan con CD20, p.ej., el Rituxan. Por ejemplo, en una realización, los sujetos pueden someterse a tratamiento estándar con quimioterapia de dosis elevada seguido del trasplante de células madre de sangre periférica. En determinadas realizaciones, tras el trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunitarias expandidas de la presente invención. En una realización adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

La dosis de los tratamientos anteriormente indicados que debe administrarse en el paciente variará con la naturaleza precisa de la condición bajo tratamiento y el receptor del mismo. El escalado de las dosis para la administración humana puede llevarse a cabo según prácticas aceptadas en la técnica. La dosis de CAMPATH, por ejemplo, generalmente se encontrará comprendida en el intervalo de entre 1 y aproximadamente 100 mg para un paciente adulto, habitualmente administrados diariamente durante un periodo de entre 1 y 30 días. La dosis diaria preferente es de entre 1 y 10 mg al día, aunque en algunos casos pueden utilizarse dosis más grandes, de hasta 40 mg al día (descritos en la patente US nº 6.120.766).

Ejemplos experimentales

La invención se describe en mayor detalle en referencia a los ejemplos experimentales siguientes. Los presentes ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos únicamente y no pretenden ser limitativos, a menos que se especifique lo contrario. De esta manera, la invención no debe interpretarse en modo alguno como limitada a los ejemplos siguientes, sino, por el contrario, debe interpretarse que comprende todas y cada una de las variaciones que resultarán evidentes como consecuencia de la enseñanza proporcionada en la presente memoria.

Sin descripción adicional, se cree que un experto ordinario en la materia puede, utilizando la descripción anterior y los ejemplos ilustrativos a continuación, llevar a cabo y utilizar los compuestos de la presente invención y poner en práctica los métodos reivindicados. Los ejemplos de trabajo siguientes, por lo tanto, señalan específicamente realizaciones preferentes de la presente invención, y no deben interpretarse como limitativas en modo alguno del resto de la exposición.

Ejemplo 1: las células T que expresan receptores quiméricos reducen el número normal de células B e inducen tolerancia

Los resultados presentados en la presente memoria demuestran que las células CART 19 persisten y proporcionan un beneficio terapéutico en el paciente durante por lo menos 18 meses. Las células T manipuladas se expandieron más de mil veces *in vivo*, se transportaron a la médula ósea y continuaron expresando CAR funcionales a niveles elevados durante por lo menos 6 meses. De media, cada célula T CAR⁺ infundida erradicó por lo menos 100 células de LLC. Se demostró una respuesta inmunitaria específica de CD19 en la sangre y la médula ósea, acompañada por una remisión completa en dos de tres pacientes. Una parte de las células persistió como células T CAR⁺ de memoria, indicando el potencial de dicho enfoque no restringido a CMH como tratamiento eficaz de las neoplasias malignas de células B.

A continuación, se describen los materiales y métodos utilizados en dichos experimentos.

Materiales y métodos:

Diseño del protocolo

Se llevó a cabo el ensayo clínico (NCT01029366) tal como se indica en el documento nº WO 2012/079000.

Producción de vector

Se diseñó el transgén CD19-BB-z (GeMCRIS 0607-793) y se construyó tal como se indica (Milone et al., Mol. Ther. 17:1453-1464, 2009). Se produjo un vector lentivírico según las buenas prácticas de fabricación actuales utilizando un enfoque de producción de tres plásmidos en Lentigen Corporation, tal como se ha descrito (Zufferey et al., Nature Biotechnol 15:871-875, 1997).

Preparación de producto de las células CART19

Los métodos de preparación de células T utilizando perlas de poliestireno paramagnéticas recubiertas con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 han sido descritas (Laport et al., Blood 102: 2004-2013, 2003). La transducción lentivírica se llevó a cabo tal como se ha descrito (Levine et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:17372-17377, 2006).

A continuación, se indican los resultados de los experimentos.

Expansión *in vivo* y persistencia de CART19 y transporte a la médula ósea

Las células T CAR⁺ expandidas utilizando perlas de CD3/CD8 y la expresión de un dominio de señalización de 4-1BB se cree que mejora los CAR que no presentan 4-1BB. Se desarrolló un ensayo de Q-PCR para permitir el rastreo cuantitativo de las células CART19 en sangre y médula ósea. Todos los pacientes mostraron expansión y persistencia de las células CART19 en la sangre durante por lo menos 6 meses, tal como se ilustra en las figuras 1A y 1C. Cabe destacar que los pacientes UPN 01 y UPN 03 presentaron una expansión de 1.000 a 10.000 veces de las células T CAR⁺ en sangre durante el primer mes posterior a la infusión. Los niveles de expansión máximos coincidieron con la aparición de síntomas clínicos post-infusión en el paciente UPN 01 (día 15) y en el paciente UPN 03 (día 23). Además, tras la caída inicial que puede modelarse con una cinética de primer orden, los niveles de células T CART19 se estabilizaron en los 3 pacientes entre los días 90 y 180 posteriores a la infusión. Resulta significativo que las células T CART19 también fueron transportadas a la médula ósea en todos los pacientes, aunque a niveles 5 a 10 veces más bajos que los observados en la sangre, tal como se ilustra en las figuras 1D a 1F. Los pacientes UPN 01 y 03 mostraban una caída log-lineal en la médula, con una T_{1/2} de desaparición de ~35 días.

Expresión prolongada y establecimiento de una población de células CART19 de memoria en sangre

Una cuestión crucial en la inmunoterapia del cáncer mediada por CAR es si los dominios optimizados de producción y coestimulación celular potencian la persistencia de las células T modificadas genéticamente y permiten el establecimiento de las células T CAR⁺ de memoria en el paciente. Los estudios anteriores han demostrado una expansión robusta, persistencia prolongada y/o expresión de los CAR sobre las células T tras la infusión (Kershaw et al., Clin. Cancer Res. 12:6106-6115, 2006; Lamers et al., J. Clin. Oncol. 24:E20-e22, 2006; Till et al., Blood, 112, 2261-2271, 2008; Savoldo et al., J. Clin. Invest. doi:10.1172/JCI46110, 2011). El análisis de citometría de flujo de muestras tanto de sangre como de médula 169 días después de la infusión reveló la presencia de células expresantes de CAR19 en UPN 03 (figuras 2a y 2b) y una ausencia de células B, tal como se ilustra en la figura 2A. Cabe destacar que, según el ensayo de Q-PCR, la totalidad de los tres pacientes presentaba células CAR⁺ persistentes a los 4 meses y posteriormente, tal como se ilustra en las figuras 1 y 4. La frecuencia *in vivo* de las células CAR⁺ según la citometría de flujo era estrechamente similar a la obtenida en el ensayo de PCR para el transgén de CART19. Resulta importante que en el paciente UPN 03, sólo las células CD3⁺ expresaban CAR19, ya que las células CAR19⁺ no eran detectables en los subgrupos positivos para CD16 o CD14, tal como se ilustra en la figura 2A. La expresión de CAR también se detectó sobre la superficie de 4,2% de las células T en la sangre del paciente UPN 01 el día 71 después de la infusión, tal como se ilustra en la figura 5.

A continuación, se utilizó citometría de flujo policromática para llevar a cabo estudios detallados para caracterizar adicionalmente la expresión, fenotipo y función de las células CART19 en UPN 03 utilizando un anticuerpo anti-idiotipo de CAR (MDA-647) y una estrategia de acotamiento en subgrupos mostrada en la figura 6. Se observaron notables diferencias en la expresión de marcadores de memoria y activación tanto en células CD8⁺ como CD4⁺ basándose en la expresión de CAR19. El día 56, las células CD8⁺ CART19 mostraron principalmente un fenotipo de memoria de efector (CCR7-CD27-CD28⁻) consistente con la exposición prolongada y robusta a antígeno, tal como se ilustra en la figura 2C. En contraste, las células CD8⁺ CAR-negativas consistían en mezclas de células efectoras y de memoria central, con expresión de CCR7 en un subgrupo de células y un número sustancial en las fracciones CD27+/CD28⁻ y CD27+/CD28⁺. Aunque las poblaciones celulares tanto CART19 como negativas para CAR expresaron sustancialmente CD57, dicha molécula no se coexpresó uniformemente con PD-1 en las células CART19, un posible reflejo de la amplia historia de replicación de dichas células. En contraste con la población de células CAR-negativas, la totalidad de la población CD8⁺ CART19 no expresaba ni CD25 ni CD127. Alcanzado el día 169, aunque el fenotipo de la población celular negativa para CAR seguía siendo similar a la de la muestra del día 56, la población CART19

había evolucionado para contener una población minoritaria con características de células de memoria central, especialmente la expresión de CCR7, niveles más elevados de CD27 y CD28, así como células CAR⁺ que eran negativas para PD-1, negativas para CD57 y positivas para CD127.

- 5 En el compartimiento CD4⁺, el día 56, las células CART19 se caracterizaron por la falta uniforme de CCR7 y una predominancia de células CD27⁺/CD28⁺/PD-1⁺ distribuidas tanto en el compartimiento CD57⁺ como CD57⁻ y esencialmente la ausencia de expresión de CD25 y CD127, tal como se ilustra en la figura 2B. En contraste, las células negativas para CAR en dicho punto temporal eran heterogéneas en su expresión de CCR7, CD27 y PD-1, expresaban CD127 y también contenían una población sustancial de células CD25⁺/CD127⁻ (potenciales células T reguladoras).
- 10 Alcanzado el día 169, mientras que la expresión de CD28 se mantuvo uniformemente positiva en todas las células CAR⁺CD4⁺, una fracción de las células CD4⁺ CART19 había evolucionado hacia un fenotipo de memoria central con expresión de CCR7, un porcentaje más elevado de células CD27⁻, la aparición de un subgrupo negativo para PD-1 y la adquisición de la expresión de CD127. Las células negativas para CAR se mantuvieron razonablemente consistentes con sus contrapartidas de día 56, con la excepción de una reducción de la expresión de CD27, una
- 15 reducción del porcentaje de las células CD25⁺/CD127⁻.

Las células CART19 pueden conservar la función efectora tras 6 meses en la sangre.

- Además de la corta persistencia e inadecuada proliferación *in vivo*, una limitación de los ensayos anteriores con células T CAR⁺ ha sido la rápida pérdida de actividad funcional de las células T infundidas *in vivo*. El nivel elevado de persistencia de las células CART19 y la expresión en superficie de la molécula de CAR19 en los pacientes UPN 01 y 03 proporcionó la oportunidad de someter a ensayo directamente las funciones efectoras específicamente anti-CD19 en células recuperadas de muestras de sangre periférica crioconservadas. Las PBMC del paciente UPN 03 se cultivaron con células diana que eran positivas o negativas para la expresión de CD19. Se demostró una función efectora específica de CD19 robusta de las células T CART19 mediante desgranulación específica contra células diana positiva para CD19, aunque no negativas para CD19, según evaluación de la expresión en superficie de CD107a. Cabe destacar que la exposición de la población de CART19 a dianas positivas para CD19 indujo una rápida internalización de CAR-19 de superficie, tal como se ilustra en la figura 6 para la expresión en superficie de CAR19 en las mismas células efectoras en tinción de citometría de flujo estándar. La presencia de moléculas coestimuladoras sobre las células diana no resultaba necesaria para inducir la desgranulación de las células CART19 debido a que la línea NALM-6 no expresa CD80 o CD86 (Brentjens et al., Clin. Cancer Res. 13:5426-5435, 2007). La función efectora era evidente el día 56 después de la infusión y se conservaba en el punto temporal del día 169. También pudo demostrarse una robusta función efectora de las células T CAR⁺ y CAR⁻ mediante estimulación farmacológica.

35 Activación clínica de células CART19

- No se observaron toxicidades significativas durante los cuatro días posteriores a la infusión en ningún paciente, aparte de reacciones febriles transitorias. Sin embargo, todos los pacientes desarrollaron posteriormente toxicidades clínicas y de laboratorio significativas entre los días 7 y 21 después de la primera infusión. Dichas toxicidades eran a corto plazo y reversibles. De los tres pacientes tratados hasta el momento, había 2 CR y 1 PR a los >6 meses después de la infusión de CART19 según criterios estándares (Hallek et al., Blood 111:5446, 2008). En la figura 7 se ilustran datos de la historia médica pasada y respuesta a la terapia de cada paciente.

- Brevemente, el paciente UPN 01 desarrolló un síndrome febril, con escalofríos e hipotensión transitoria a partir de los 10 días siguientes a la infusión. Las fiebres persistieron durante aproximadamente 2 semanas y se resolvieron; el paciente no presentó ningún síntoma constitucional adicional. El paciente consiguió una respuesta rápida y completa, tal como se ilustra en la figura 3. Entre el mes 1 y el mes 6 después de la infusión, no se detectaron células de LLC circulantes en sangre mediante citometría de flujo. La médula ósea 1, 3 y 6 meses después de las infusiones de células CART19 mostró una ausencia sostenida del infiltrado linfocítico según la morfología y análisis de citometría de flujo, tal como se ilustra en la figura 3B. Los escaneos de TC al mes y 3 meses después de la infusión mostraron la resolución de la adenopatía, tal como se ilustra en la figura 3C. La remisión completa se había sostenido durante más de 10 meses en el momento de escribir el presente informe.

- El paciente UPN 02 se trató con 2 ciclos de bendamustina con rituximab, resultando en una enfermedad estable, tal como se ilustra en la figura 3A. El paciente recibió una tercera dosis de bendamustina como quimioterapia productora de linfopenia antes de la infusión de células T CART19. El paciente desarrolló fiebre de 40°C, escalofríos y disnea que requirió una hospitalización de 24 horas el día 11 después de la primera infusión y el día del segundo refuerzo de células CART19. La fiebre y síntomas constitucionales persistieron y el día 15, el paciente presentó una disfunción cardíaca transitoria; todos los síntomas se resolvieron tras iniciar el día 18 terapia de corticoesteroides. Tras la infusión de CART19 y coincidiendo con la aparición de fiebre alta, el paciente eliminó rápidamente las células de LLC deficientes en p53 de la sangre periférica, tal como se ilustra en la figura 3A y una reducción de parcial de adenopatía, la médula ósea mostró infiltración amplia persistente de LLC, un mes después de la terapia a pesar de una drástica citorreducción sanguínea. El paciente se mantuvo asintomático.

- El paciente UPN 03 recibió pentostatina y ciclofosfamida como quimioterapia productora de linfopenia antes de la infusión de células CART19. Tres días después de la quimioterapia, aunque antes de la infusión celular, la médula

ósea era hipercelular (60%), con una afectación de aproximadamente 50% por el LLC. El paciente recibió una dosis baja de células CART19 ($1,5 \times 10^5$ células T CAR⁺/kg divididos a lo largo de 3 días). Nuevamente, no se observaron toxicidades infusionales agudas. Sin embargo, 14 días después de la primera infusión, el paciente empezó a presentar escalofríos, fiebre, náusea y diarrea. Alcanzado el día 22 después de la infusión, se diagnosticó síndrome de lisis tumoral que requirió hospitalización. El paciente presentó resolución de los síntomas constitucionales, y en 1 mes de infusiones de CART19, el paciente había eliminado el LLC circulante de la sangre y médula ósea según análisis morfológico, de citometría de flujo, citogenético y de FISH. Los escaneos de TC mostraron la resolución de la adenopatía anormal, tal como se ilustra en las figuras 3B y 3C. La remisión completa se sostuvo más allá de los 8 meses después de la infusión inicial de células CART19.

Consideraciones sobre la proporción *in vivo* de células efectoras CART19 a células diana de LLC

Los estudios preclínicos han demostrado que los tumores grandes pueden eliminarse y que la infusión de $2,2 \times 10^7$ CAR podría erradicar los tumores que comprenden 1×10^9 células, para una proporción *in vivo* E:T de 1:42 en ratones humanizados (Carpenito et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:3360-3365, 2009), aunque estos cálculos no consideraban la expansión de las células T después de la inyección. La estimación de la carga de tumor de LLC durante el tiempo permitió calcular la reducción del tumor y las proporciones E:T de CART19 estimados conseguidos *in vivo* en los tres sujetos basados en el número de células T CAR⁺ infundadas. Se calcularon las cargas tumorales mediante medición de la carga de LLC en médula ósea, sangre y tejidos linfoides secundarios. Las cargas tumorales de línea base mostradas en la figura 7 indican que cada paciente presentaba del orden de 10^{12} células de LLC (es decir, una carga tumoral de 1 kilogramo) antes de la infusión de CART19. El paciente UPN 03 presentaba una carga tumoral de línea base estimada de $8,8 \times 10^{11}$ células de LLC en la médula ósea el día -1 (es decir, post-quimioterapia y pre-infusión de CART19) y una masa tumoral medida en tejidos linfoides secundarios de $3,3-5,5 \times 10^{11}$ células de LLC, según el método de análisis volumétrico del escaneo de TC. Dado que en UPN 03 se habían infundado únicamente $1,4 \times 10^7$ células CART19, utilizando la estimación de carga tumoral total inicial ($1,3 \times 10^{12}$ células de LLC) y que no eran detectables las células de LLC después del tratamiento, se consiguió una impresionante proporción E:T de 1:93.000. Mediante cálculos similares, se calculó una proporción E:T eficaz *in vivo* de 1:2200 y 1:1000 para UPN 01 y UPN 02. Al final, una contribución de la eliminación en serie por las células T CART19, en combinación con la expansión *in vivo* de CART19 de >1.000 veces probablemente contribuyó a los potentes efectos antileucémicos mediados por las células CART19.

Las células T que expresan receptores quiméricos establecen efectos antitumorales de memoria potentes en los pacientes con leucemia avanzada.

La expresión *in vivo* y la función efectora limitadas de los CAR han sido limitaciones cruciales en los ensayos de análisis de los CAR de primera generación (Kershaw et al., Clin. Cancer Res. 12:6106-6115, 2006; Lamers et al., J. Clin. Oncol. 24:E20-e22, 2006; Till et al., Blood, 112, 2261-2271, 2008; Park et al., Mol. Ther. 15:825833, 2007; Pule et al., Nat. Med. 14:1264-1270, 2008). Basándose en el modelo preclínico que demuestra una persistencia potenciada de los CAR que contienen un módulo de señalización de 4-1BB (Milone et al., Mol. Ther. 17:1453-1464, 2009; Carpenito et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:3360-3365, 2009), se diseñaron experimentos para desarrollar una segunda generación de CAR manipulados con tecnología de vector lentivírico. Dicha segunda generación de CAR se encontró que era segura en el contexto de la infección crónica por VIH (Levine et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 103:17372-17377, 2006). Los presentes resultados muestran que, al expresar dicha segunda generación de CAR en las células T y se cultivarlas bajo condiciones diseñadas para estimular la injertación de células T de memoria central (Rapoport et al., Nat. Med. 11:1230-1237, 2005; Bondanza et al., Blood 107:1828-1836, 2006), se observa una expansión mejorada de las células T CAR después de la infusión en comparación con los informes anteriores. Las células CART19 establecieron una memoria celular específica de CD19 y eliminaron las células tumorales a proporciones E:T *in vivo* no conseguidas anteriormente.

CART19 es el primer ensayo de CAR que incorpora un dominio de señalización de 4-1BB y el primero en utilizar tecnología de vectores lentivíricos. Los presentes resultados demuestran un transporte dirigido eficiente de los CAR a los sitios de tumor, con el establecimiento *de facto* de "linfocitos infiltrantes de tumor" que mostraban especificidad de CD19. La expansión *in vivo* pronunciada permitió la primera demostración de que los CAR recuperados directamente de pacientes pueden conservar la función efectora *in vivo* durante meses. Un estudio anterior ha sugerido que la introducción de un CAR de primera generación en células T específicas de virus resulta preferente a células T primarias (Pule et al., Nat. Med. 14:1264-1270, 2008); sin embargo, los resultados con CAR de segunda generación introducidos en células T primarias coestimuladas pone en duda esta noción. Sin deseo de restringirse a ninguna teoría en particular, se aconseja cautela ya que los efectos clínicos son profundos y sin precedentes, con la lisis de cargas tumorales de tamaños de kilogramos en la totalidad de los tres pacientes, acompañada de la liberación retardada de niveles elevados potencialmente peligrosos de citoquinas en dos de los pacientes. No se observaron los clásicos efectos de tormenta de citoquinas. Sin embargo, el presente estudio se diseñó para mitigar dicha posibilidad mediante la infusión deliberada de CART19 durante un periodo de tres días.

Se encontró que las dosis muy bajas de CAR pueden inducir respuestas clínicas potentes. Lo anterior era un estudio piloto para demostrar la seguridad del diseño del vector de CART19. La observación de que las dosis de células CART19 varios órdenes de magnitud inferiores a los sometidos a ensayo en ensayos anteriores pueden presentar un

beneficio clínico podría presentar importantes implicaciones para la futura implementación de la terapia de CAR a una escala más grande, y en el diseño de ensayos que estudien los CAR dirigidos contra dianas diferentes de CD19.

Los presentes estudios indican además que CART19 se expresa tanto en células T de memoria central como en efectoras, y ello probablemente contribuye a su largo tiempo de supervivencia en comparación con informes anteriores. Sin deseo de restringirse a ninguna teoría en particular, las células T CAR podrían diferenciarse *in vivo* en un estado de tipo memoria central tras el encuentro y posterior eliminación de las células diana (p.ej., células tumorales de LLC o células B normales) que expresan el antígeno sustitutivo. En efecto, la señalización de 4-1BB se ha informado que estimula el desarrollo de memoria en el contexto de la señalización de TCR (Sabbagh et al., Trends Immunol. 28:333-339, 2007).

La proliferación y supervivencia extendidas de CART19 ha revelado aspectos de la farmacocinética de las células T CAR que no han sido informados anteriormente. Se ha observado que la cinética de la liberación de citoquinas en suero y médula se correlaciona con los niveles pico de CART19, por lo que sería posible que la caída se inicie al volverse limitantes las dianas celulares que expresan CD19. El mecanismo de supervivencia prolongada de CART19 podría relacionarse con la incorporación anteriormente mencionada del dominio 4-1BB o con la señalización a través de TCR y/o CAR natural. Una posibilidad intrigante es que la supervivencia prolongada se relacione con la población de CART19 que se ha identificado en especímenes de médula, planteando la hipótesis de que los CAR CD19 podrían mantenerse mediante el encuentro con los progenitores de las células B en la médula ósea. En relación a lo anterior, ¿qué controla la expansión inicial de las células CART19 *in vivo*? Con raras excepciones (Savoldo et al., J. Clin. Invest., doi: 10.1172/JCI46110, 2011; Pule et al., Nat. Med. 14:1264-1270, 2008), el presente estudio es el único ensayo en que se han omitido las infusiones de IL-2, de manera que las células CART19 probablemente se expandieron en respuesta a citoquinas homeostáticas o, más probablemente, a CD19 expresado sobre dianas leucémicas y/o células B normales. En el último caso, lo anterior podría ser una característica atractiva de los CAR dirigidos contra dianas sobre APC normales, tales como CD19 y CD20, ya que resulta posible que la autorrenovación de CART19 se produzca sobre las células normales, proporcionando un mecanismo para la memoria de CAR mediante “autovacunación/refuerzo” y, por lo tanto, la inmunovigilancia tumoral a largo plazo. Los mecanismos de homeostasis de CART19 podrían requerir estudio adicional para dilucidar los mecanismos celulares intrínsecos y extrínsecos de persistencia. Anteriormente a dichos resultados, la mayoría de investigadores habían considerado la terapia de CAR como una forma transitoria de inmunoterapia; sin embargo, los CAR con dominios de señalización optimizados poseen un papel tanto en la inducción de remisión y consolidación, como también en la inmunovigilancia a largo plazo.

Se han observado potenciales efectos antileucémicos en la totalidad de los tres pacientes, incluyendo dos pacientes con leucemia deficiente en p53. Los estudios anteriores con CAR han presentado dificultad para separar los efectos antitumorales de la quimioterapia productora de linfopenia. Sin embargo, la liberación retardada de citoquinas en combinación con la cinética de la lisis tumoral en pacientes refractarios a la fludarabina que era coincidente y posiblemente dependiente de la expansión *in vivo* de CAR en el presente estudio, indican que CART19 media en potentes efectos antitumorales. Los presentes resultados no excluyen un papel para la quimioterapia en la potenciación de los efectos de los CAR.

Podría resultar necesaria una comparación a fondo entre los procedimientos de vector, transgén y producción celular con los resultados de estudios que se están realizando en otros centros a fin de obtener una comprensión completa de las características clave necesarias para obtener una función sostenida de las células T CAR *in vivo*. Al contrario que las terapias de anticuerpos, las células T con modificación de CAR presentan el potencial de replicarse *in vivo* y la persistencia a largo plazo podría conducir a un control tumoral sostenido. La disponibilidad de una terapia comercial que comprende células T asesinas sin resistencias cruzadas presenta el potencial de mejorar el resultado clínico de los pacientes con neoplasias malignas de células B. Una limitación de la terapia de anticuerpos, tal como con, por ejemplo, agentes tales como el rituximab y el bevizumab, es que la terapia requiere infusiones repetidas de anticuerpos, lo que resulta incómodo y costoso. La administración de una terapia prolongada de anticuerpos (en el presente caso, por lo menos 6 meses en 3 de los 3 pacientes tratados hasta el momento) con scFv anti-CD19 expresado sobre células T seguido de una única infusión de células CART19 presenta varias ventajas prácticas, entre ellas la comodidad y los ahorros de costes.

Detección sostenida de CART19 dieciocho meses después de la infusión

Los resultados presentados en la presente memoria muestran la expresión a largo plazo de CART19 y aplasia profunda de células B (figuras 8 y 9) y una reducción de las células plasmáticas en la totalidad de los 3 pacientes (figura 10). Un resultado inesperado del ensayo de CART19 fue que las células CART19 que presentaban un scFv murino que mostraba fenotipos altamente inmunogénicos de hecho no resultaban rechazadas por el sistema inmunitario del paciente huésped. Ello sugiere que las células CART19 redujo el número de células B normales en el paciente huésped y, en consecuencia, indujo tolerancia.

Sin deseo de restringirse a ninguna teoría en particular, las células CART19 pueden utilizarse para las aplicaciones siguientes: 1) pacientes de trasplante de órgano sólido que son positivos para una “correspondencia cruzada”; eliminación de células B de memoria preexistentes que podría permitir trasplantes de órganos que actualmente no son posibles en estos pacientes inmunizados; 2) inducción de tolerancia a proteínas inmunogénicas que se administran

en pacientes (hemofílicos, por ejemplo), 3) Rituximab presenta una eficacia terapéutica en la artritis y otros trastornos autoinmunes; CART19 podría funcionar tan bien o mejor.

5 En algunos casos, las células CART19 pueden utilizarse para eliminar todos los subgrupos de células B (p.ej., no expuestas, de memoria, precursores de células plasmáticas y “B reguladoras supresoras”). Las B reguladoras podrían contribuir a la inmunosupresión en algunos cánceres y, por lo tanto, CART19 podría mejorar las respuestas inmunitarias mediante la eliminación de las B reg.

10

REIVINDICACIONES

1. Célula genéticamente modificada para expresar un CAR anti-CD19 en el que el CAR comprende un dominio de unión al antígeno CD19, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización CD3zeta, para la utilización en un método de prevención o retraso del rechazo de un tejido u órgano trasplantado en un sujeto, en el que el método comprende administrar en el sujeto una cantidad eficaz de dicha célula modificada genéticamente antes, simultáneamente o después de la administración del tejido u órgano trasplantado, en el que el dominio de unión al antígeno CD19 presenta como diana el marcador de superficie de célula B CD19, en el que la célula modificada genéticamente reduce el número de células B, y en el que la aplasia de células B se sostiene durante dieciocho meses después de la administración de la célula modificada genéticamente en el sujeto, en el que el tejido u órgano es el corazón, una válvula cardíaca, pulmón, riñón, hígado, páncreas, intestino, piel, vaso sanguíneo, médula ósea, célula madre, célula ósea o de los islotes.
2. Célula genéticamente modificada para expresar un CAR anti-CD19 en el que el CAR comprende un dominio de unión al antígeno CD19, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización CD3zeta, para la utilización en un método de tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) en un sujeto que ha recibido un trasplante de tejido u órgano, en el que el método comprende administrar en el sujeto una cantidad eficaz de dicha célula modificada genéticamente antes, simultáneamente o después de la administración del tejido u órgano trasplantado, en el que el dominio de unión al antígeno CD19 presenta como diana el marcador de superficie de célula B CD19, en el que la célula modificada genéticamente reduce el número de células B, tratando de esta manera la EICH en el sujeto, y en el que la aplasia de células B se sostiene durante dieciocho meses después de la administración de la célula modificada genéticamente en el sujeto, en el que el tejido u órgano es el corazón, una válvula cardíaca, pulmón, riñón, hígado, páncreas, intestino, piel, vaso sanguíneo, médula ósea, célula madre, o célula ósea o de los islotes.
3. Célula modificada genéticamente para la utilización según la reivindicación 2, en la que la célula modificada genéticamente se administra simultáneamente a un tejido u órgano trasplantado.
4. Célula modificada genéticamente para la utilización según la reivindicación 3, en la que la célula modificada genéticamente se administra antes de la administración del tejido u órgano trasplantado.
5. Célula modificada genéticamente para la utilización según la reivindicación 3, en la que la célula modificada genéticamente se administra después de la administración del tejido u órgano trasplantado.
6. Célula modificada genéticamente para la utilización según la reivindicación 1, en la que el método para prevenir o retrasar el rechazo de un tejido u órgano trasplantado en un sujeto puede comprender además la administración de una célula modificada genéticamente en dicho tejido u órgano antes de que dicho tejido u órgano sea trasplantado en el sujeto.
7. Célula modificada genéticamente para la utilización según la reivindicación 1, en la que el método de prevención o retraso del rechazo de un tejido u órgano trasplantado en un sujeto puede comprender además la evaluación de la presencia de células expresantes de CAR en el sujeto por lo menos una vez doce o dieciocho meses después de la administración de la célula modificada genéticamente para expresar un CAR anti-CD19.
8. Célula modificada genéticamente para la utilización según la reivindicación 1, en la que el método de prevención o retraso del rechazo de un tejido u órgano trasplantado en un sujeto comprende además la evaluación de la reducción del número de células B en el sujeto por lo menos una vez doce o dieciocho meses después de la administración de la célula modificada genéticamente para expresar un CAR anti-CD19.
9. Célula modificada genéticamente para la utilización según la reivindicación 2, en la que el método para tratar la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) comprende además la administración de una célula modificada genéticamente en dicho tejido u órgano antes de que dicho tejido u órgano sea trasplantado en el sujeto.
10. Célula modificada genéticamente para la utilización según la reivindicación 2, en la que el método para el tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) comprende además la evaluación de la presencia de células expresantes de CAR en el sujeto por lo menos una vez doce o dieciocho meses después de la administración de la célula modificada genéticamente para expresar un CAR anti-CD19.
11. Célula modificada genéticamente para la utilización según la reivindicación 2, en la que el método para el tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) comprende además la evaluación de la reducción del número de células B en el sujeto por lo menos una vez doce o dieciocho meses después de la administración de la célula modificada genéticamente para expresar un CAR anti-CD19.

Figura 1B

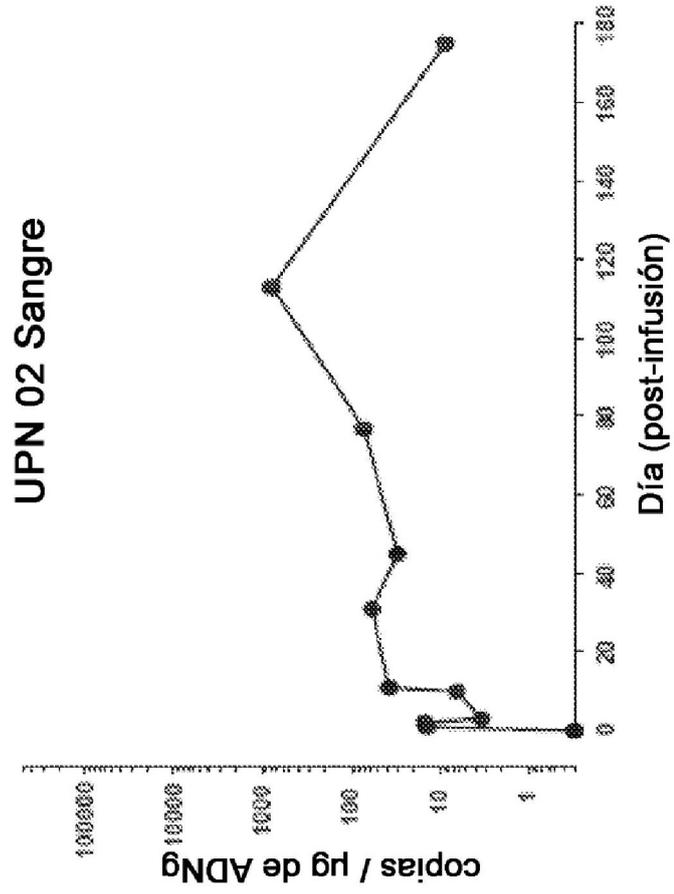


Figura 1A

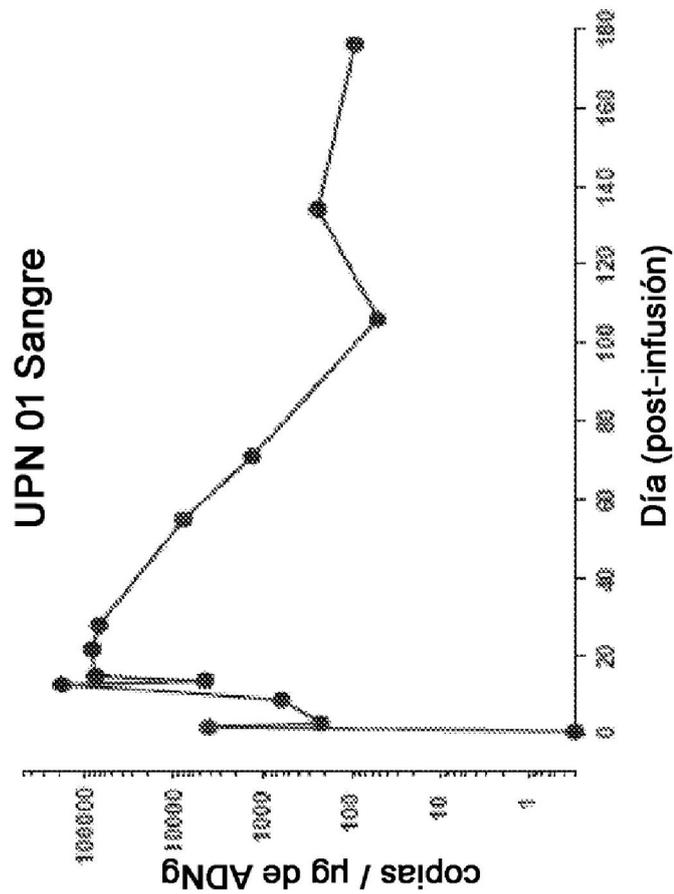


Figura 1D

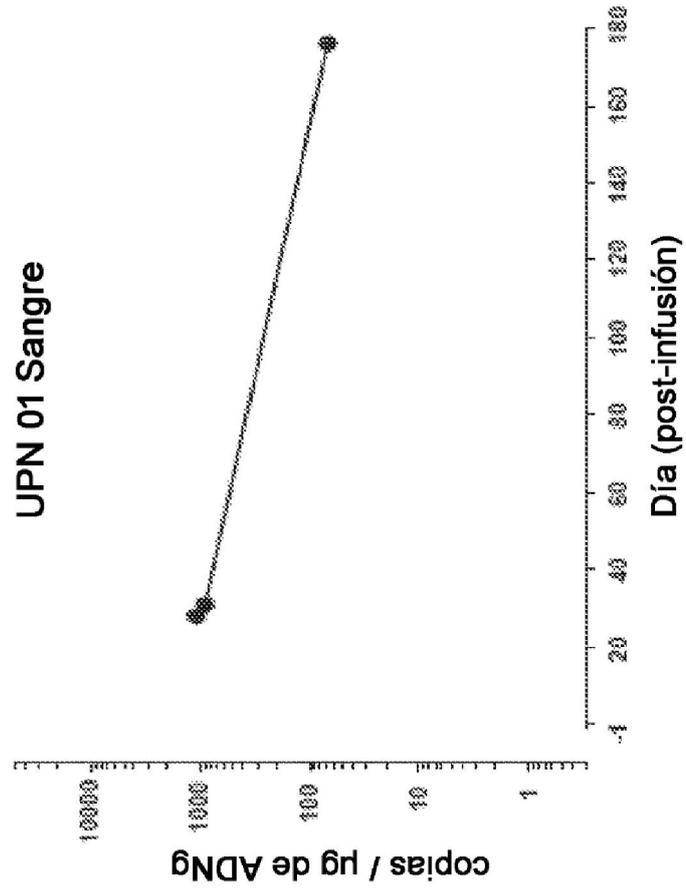


Figura 1C

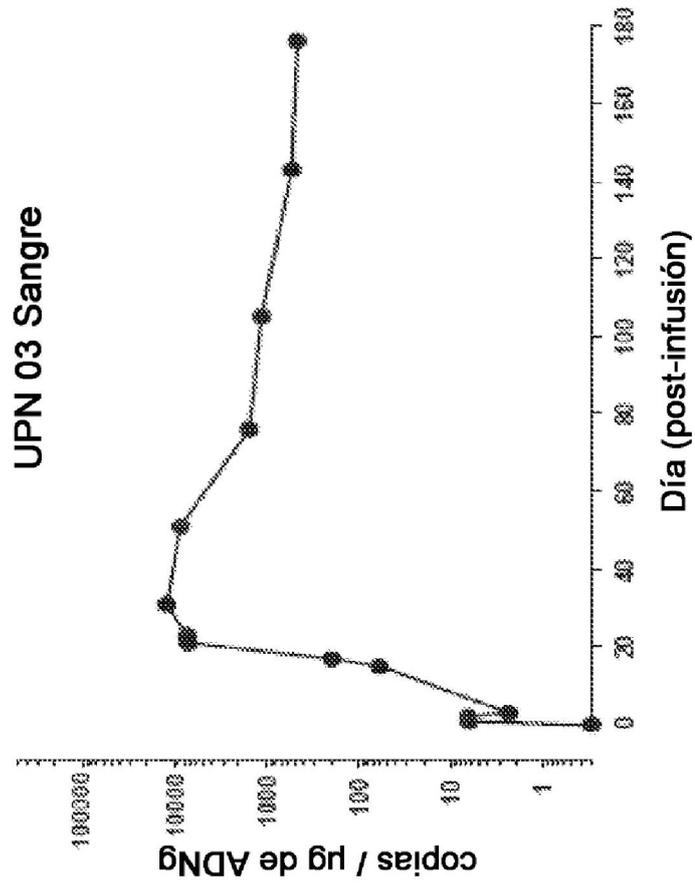


Figura 1E

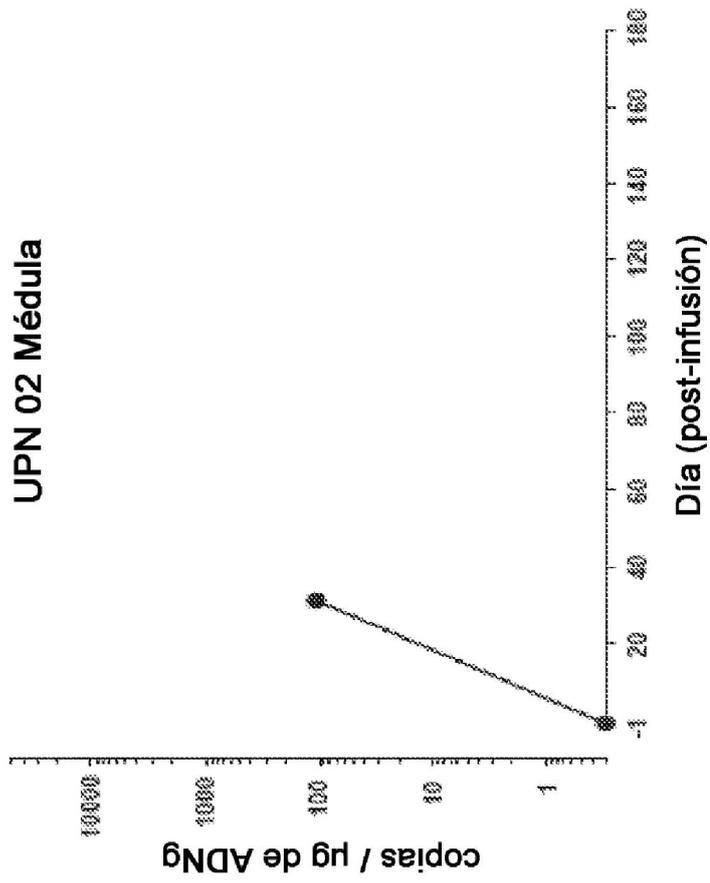
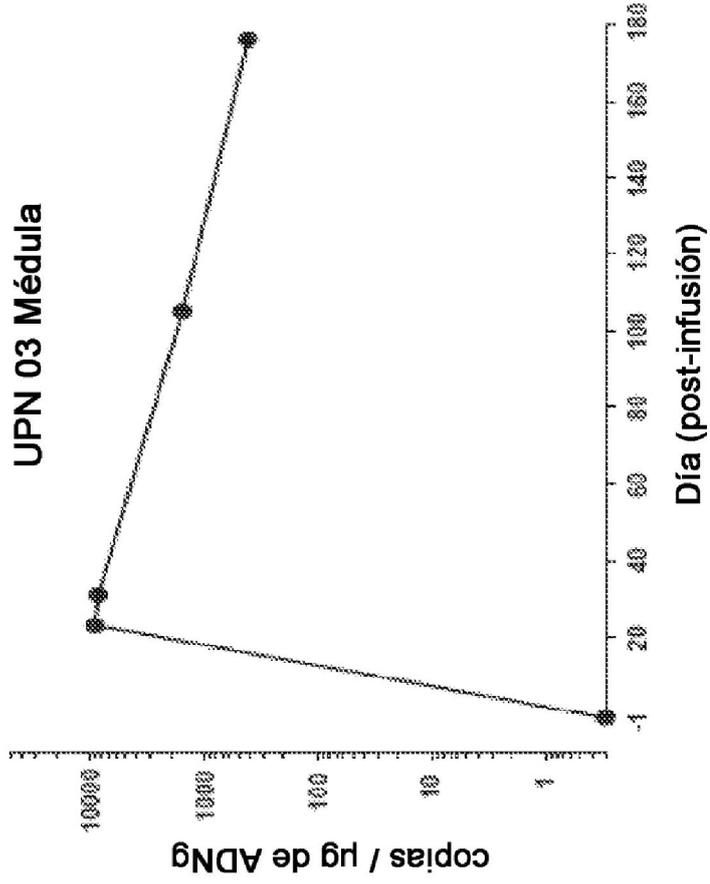


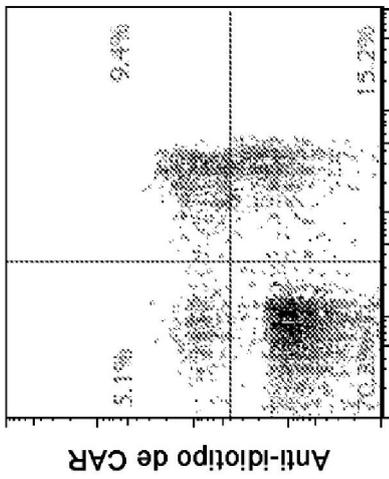
Figura 1F



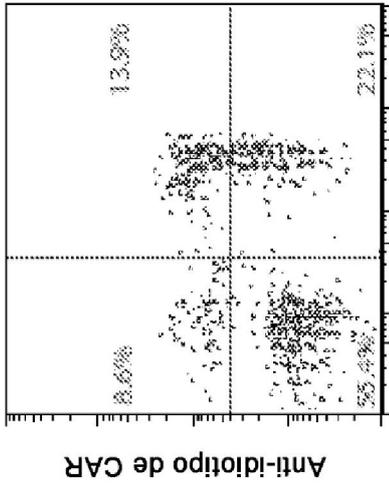
a

Subgrupo
CD3⁺

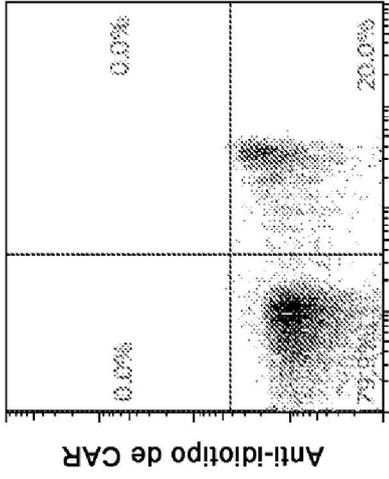
UPN 03 Sangre



UPN 03 Médula

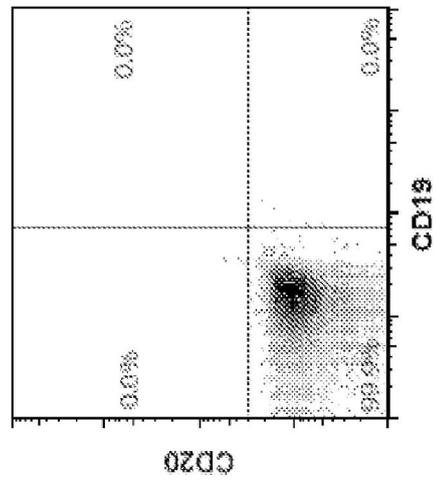


ND365

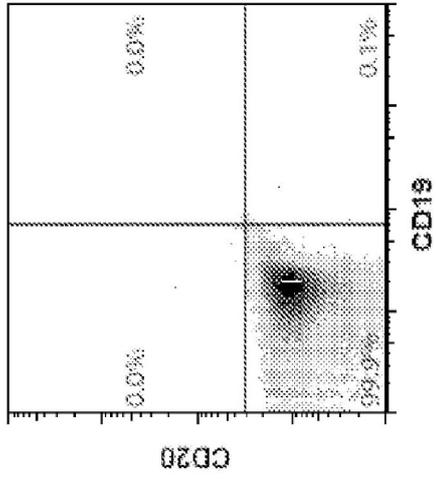


Subgrupo
CD3⁻, CD14⁻

UPN 03 Sangre



UPN 03 Médula



ND365

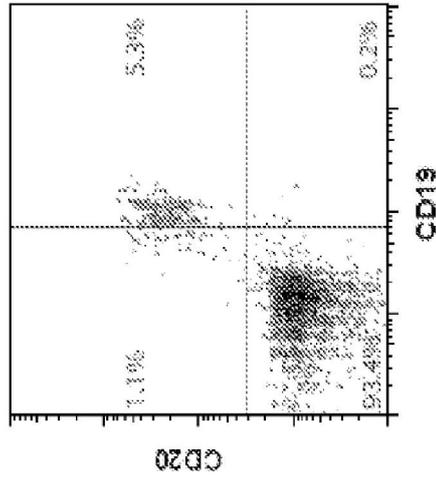


Figura 2A

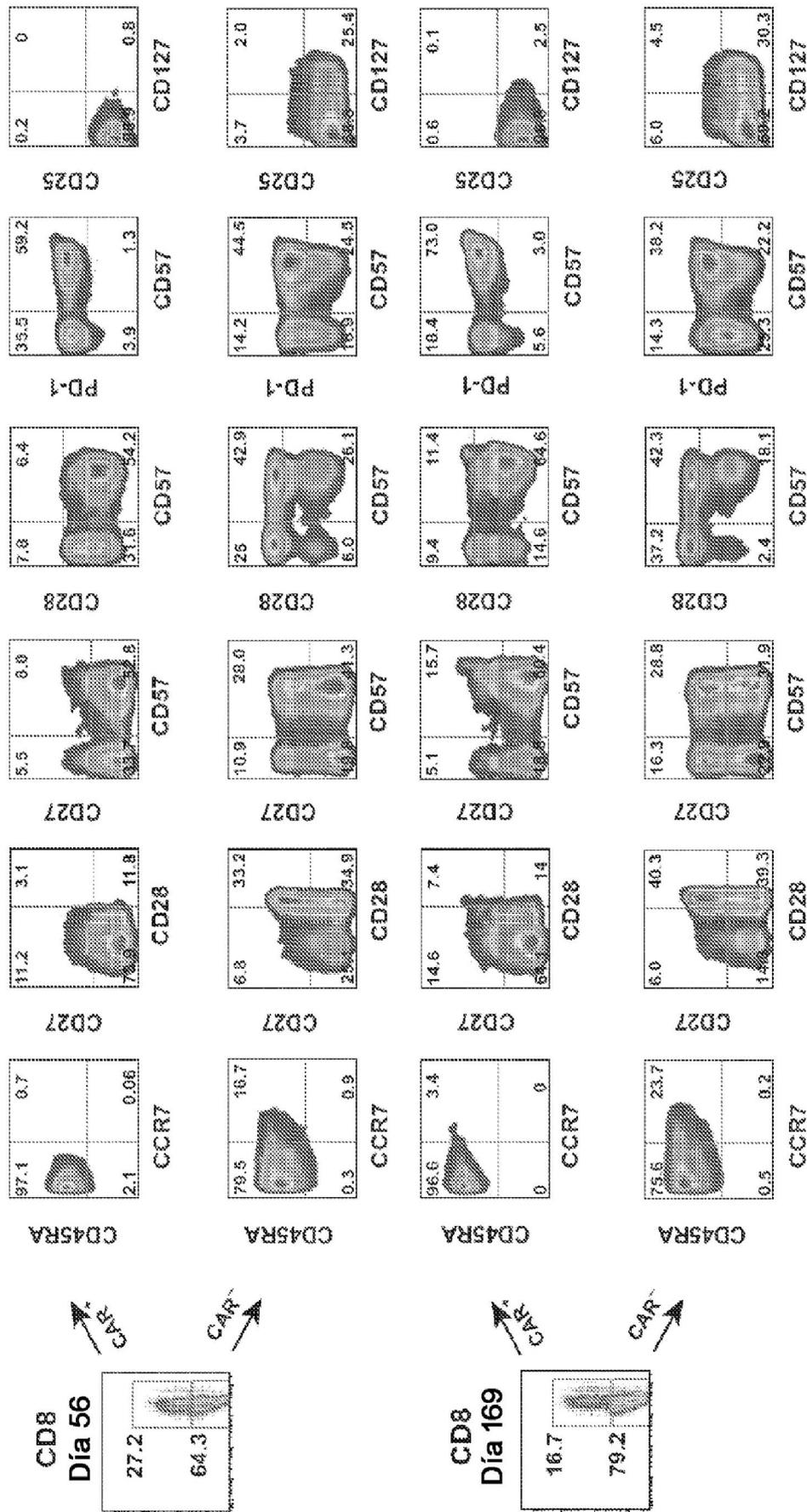


Figura 2C

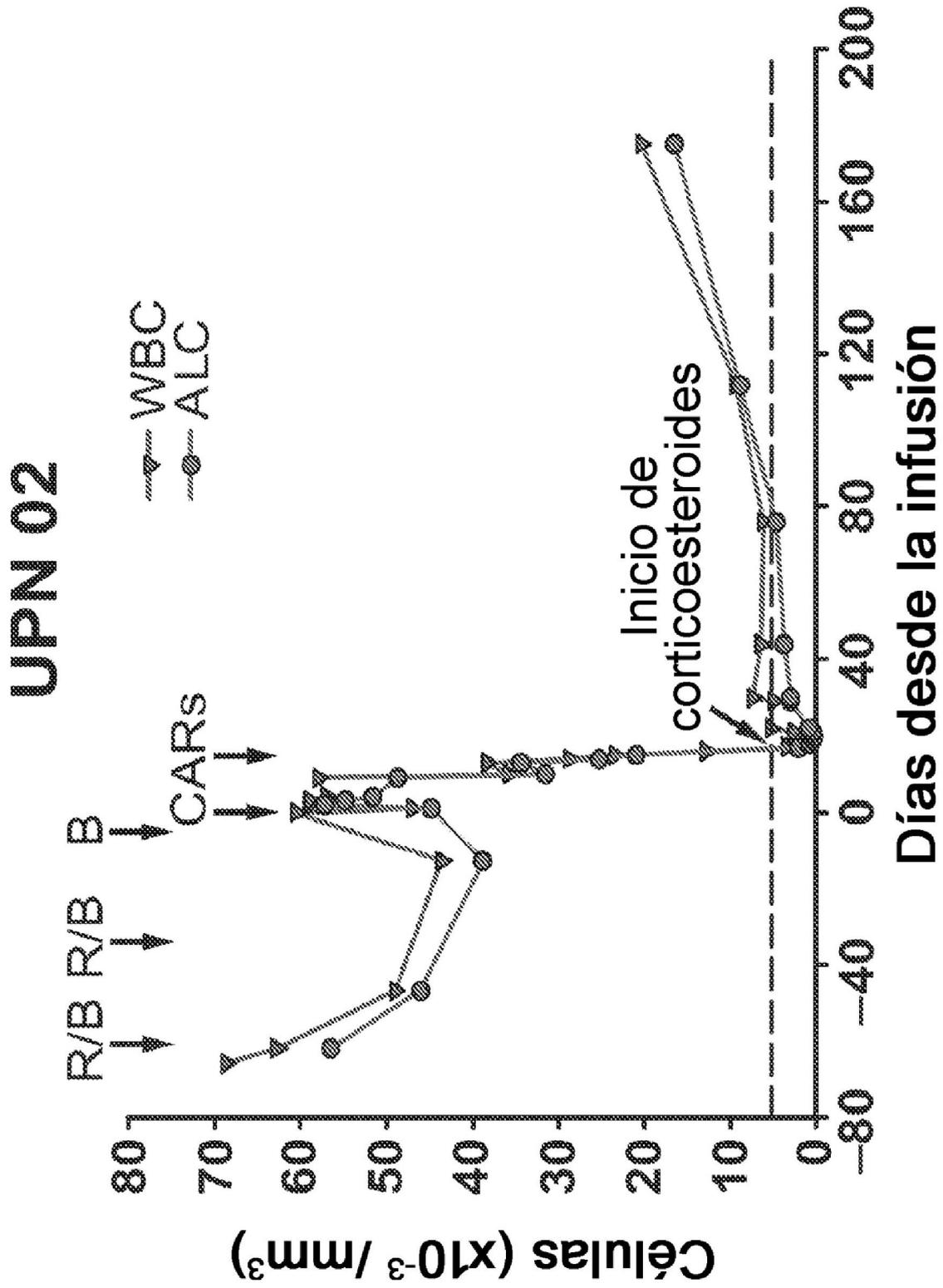
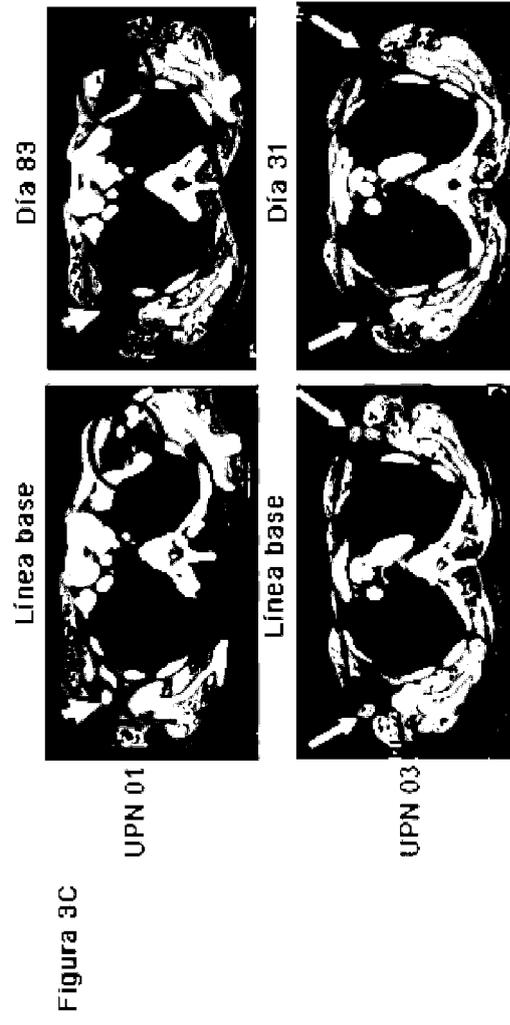
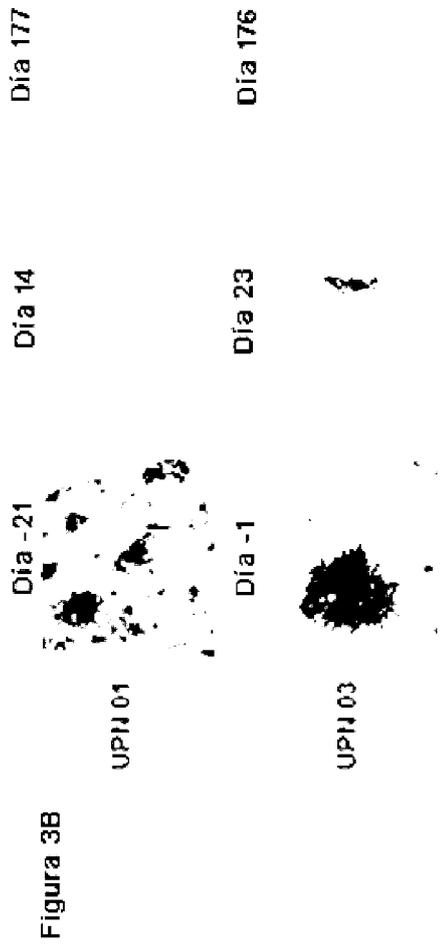


Figura 3A



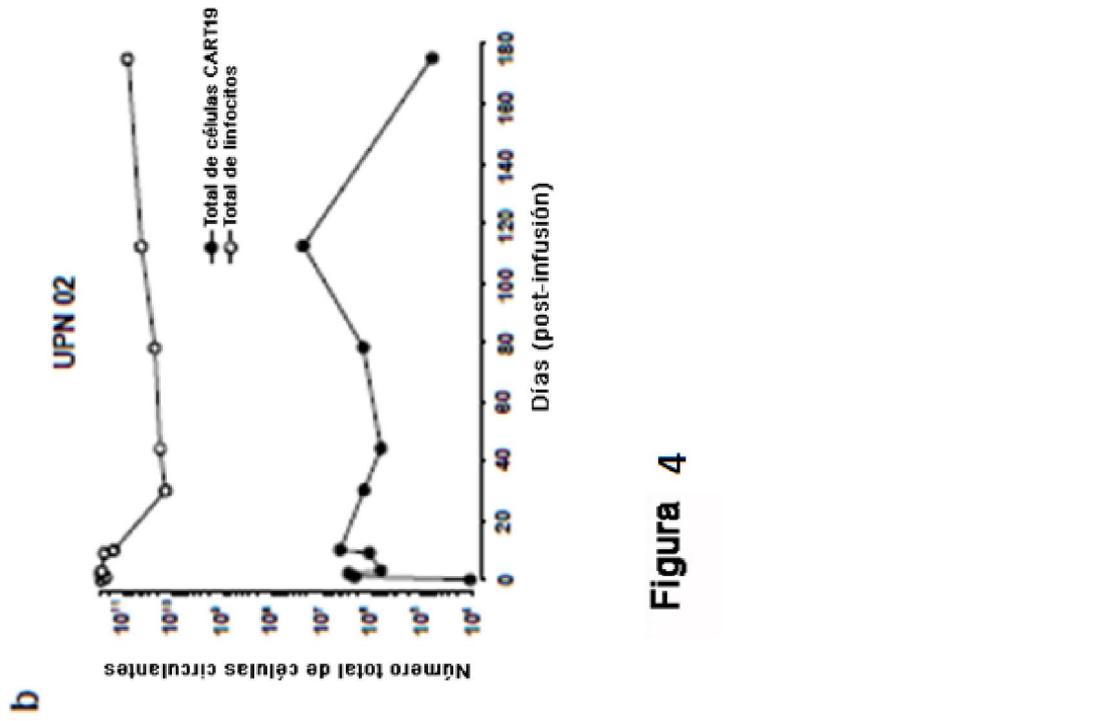


Figura 4

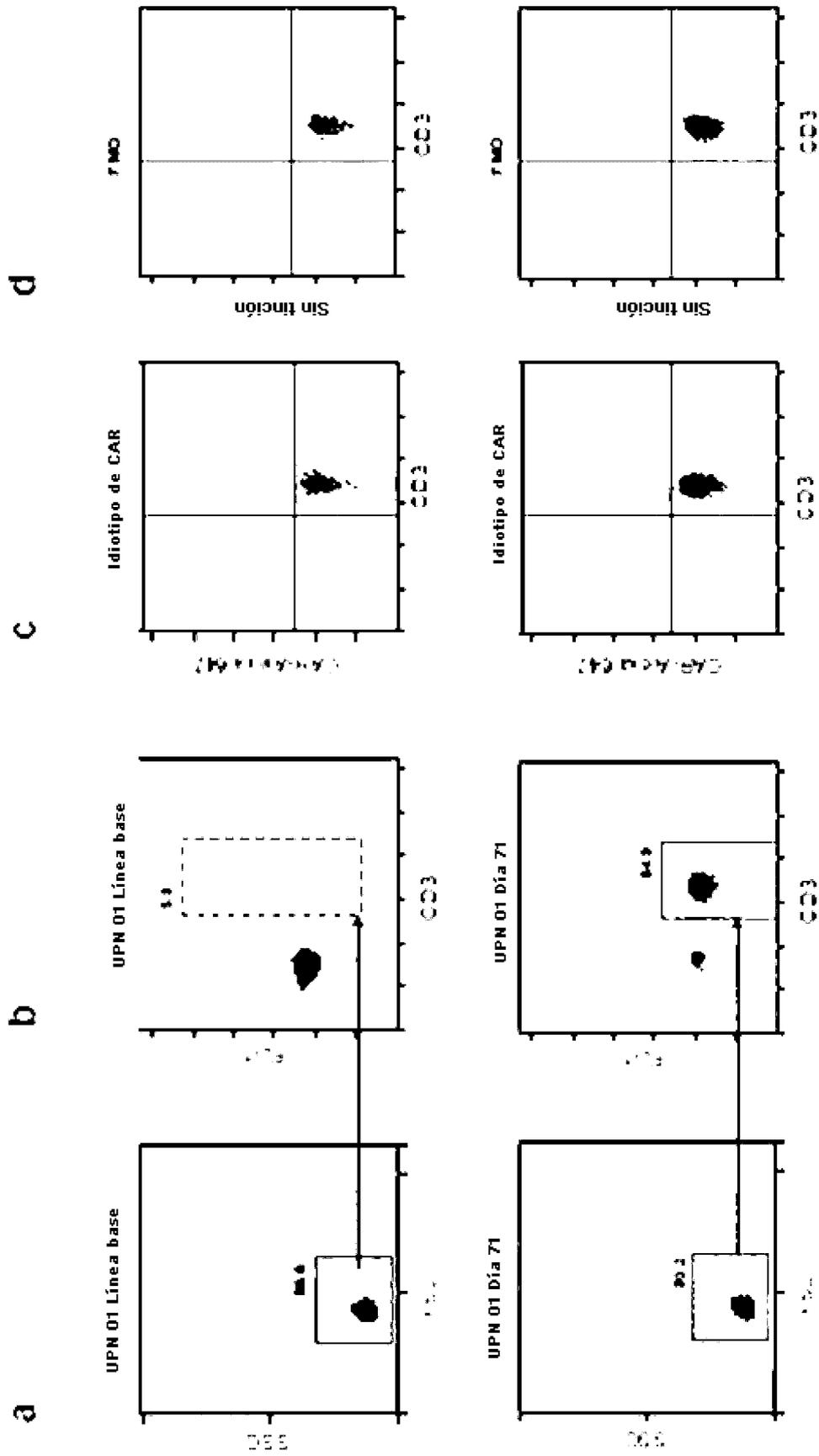


Figura 5

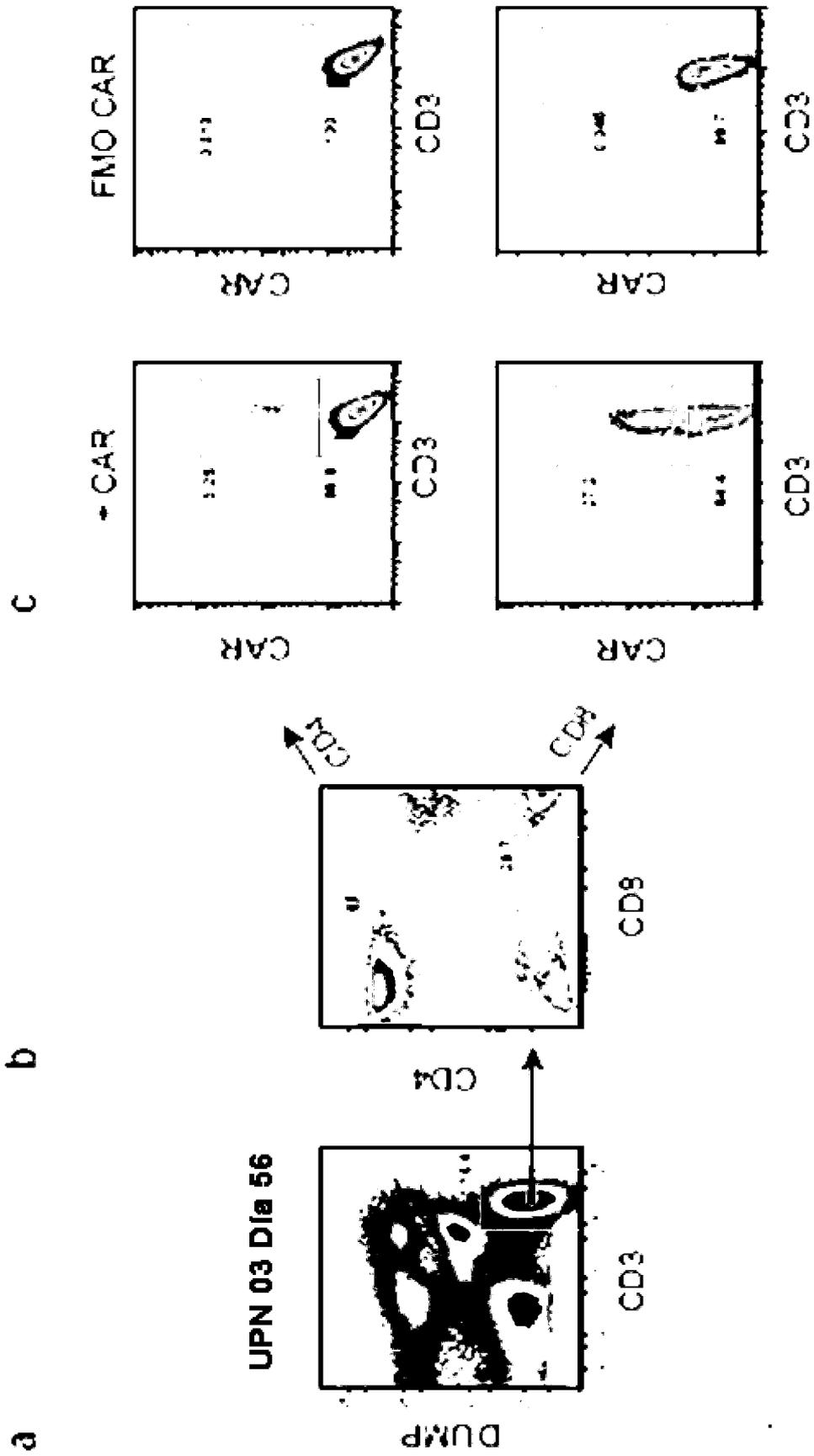


Figura 6

Sujeto UPN	Edad/sexo Cariotipo	Terapias anteriores	Carga de tumor de LLC en la línea base			Dosis total de CART19 (células/kg)	Respuesta D +30 (Duración)
			Médula ósea* (Día de estudio)	Sangre* (Día de estudio)	Ganglios/bazo* (Día de estudio)		
01	65/M normal	Fludarabina x4 ciclos (2002) Rituximab/Fludarabina x 4 ciclos (2006) Alemtuzumab x 12 sem. (2006) Rituximab (2 cursos 2008-2009) R-CVP x2 ciclos (2009) Lenalidomida (2009) PCR x2 ciclos (5/18-6/18/2010) Bendamustina x 1 ciclo (7/31-8/1/10) pre-CART19	Hipercelular 70% LLC 2,4x10 ¹² células de LLC (Día -14) 1,7x10 ¹² células de LLC (Día -1)	N/A	6,2x10 ¹¹ - 1,0x10 ¹² células de LLC (Día -37)	1,1x10 ⁸ (1,6x10 ⁷ /kg)	CR (8 o más meses)
02	77/M del(17)(p13) ¹	Alemtuzumab x 16 sem. (6/2007) Alemtuzumab x 18 sem. (3/2009) Bendamustina ² /Rituximab: 7/1/2010 (ciclo 1) 7/28/2010 (ciclo 2) 8/26/2010 (ciclo 3) pre-CART19	Hipercelular >95% LLC 3,2x10 ¹² células de LLC (Día -47)	2,75 x 10 ¹¹ células de LLC (Día -1)	1,2x10 ¹² - 2,0x10 ¹² células de LLC (Día -24)	5,8x10 ⁸ (1,0x10 ⁷ /kg)	PR (5 meses)
03	64/M del(17)(p13) ²	R-Fludarabina x2 ciclos (2002) R-Fludarabina x 4 ciclos (10/06-1/07) R-Bendamustina x 1 ciclo (2/09) Bendamustina x3 ciclos (3-5/09) Alemtuzumab x 11 sem. (12/09-3/10) Pentastatina/ciclofosfamida (9/10/10) pre-CART19	Hipercelular 40% LLC 8,8x10 ¹¹ células de LLC (Día -1)	N/A	3,3x10 ¹¹ - 5,5x10 ¹¹ células de LLC (Día -10)	1,4x10 ⁷ (1,46x10 ⁶ /kg)	CR (7 o más meses)

1.Cariotipo UPN 02 (Nomenclatura ISCN):45,XY,del(1)(q25),+del(1)(p13),t(2;20)(p13;q11.2),t(3;5)(p13;q35),add(9)(p22),?del(13)(q14q34),-14,del(17)(p13)[cp24]

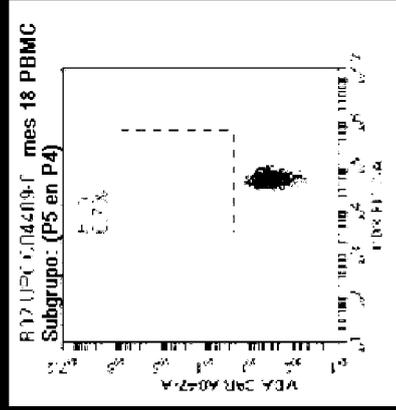
2.Cariotipo UPN 03 (Nomenclatura ISCN):46,XY,del(17)(p12)[18]/44-46,idem,der(17)(17;21)(p11.2;q11.2)[cp4]/40-45,XY,-17[cp3]

3. Ver materiales complementarios para métodos de determinación de la carga tumoral.

Figura 7

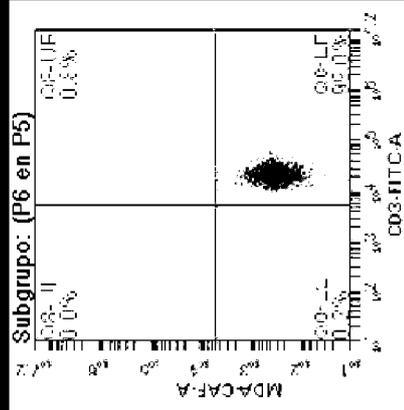
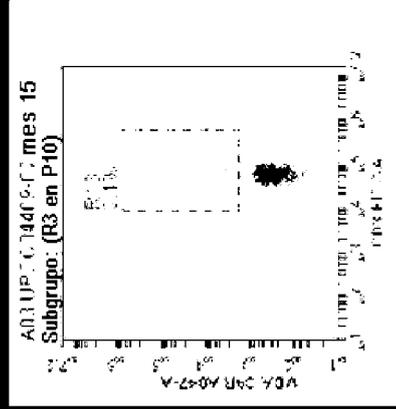
Detección sostenida de células CART19 18 meses después de la infusión

UPN01



Sangre

UPN03



Médula ósea

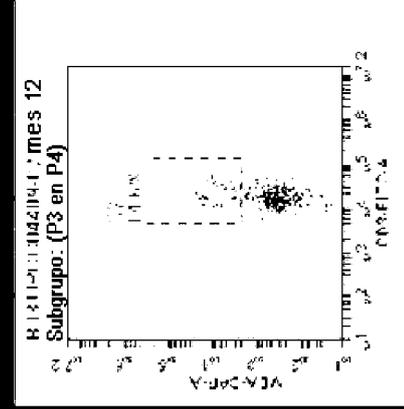


Figura 8

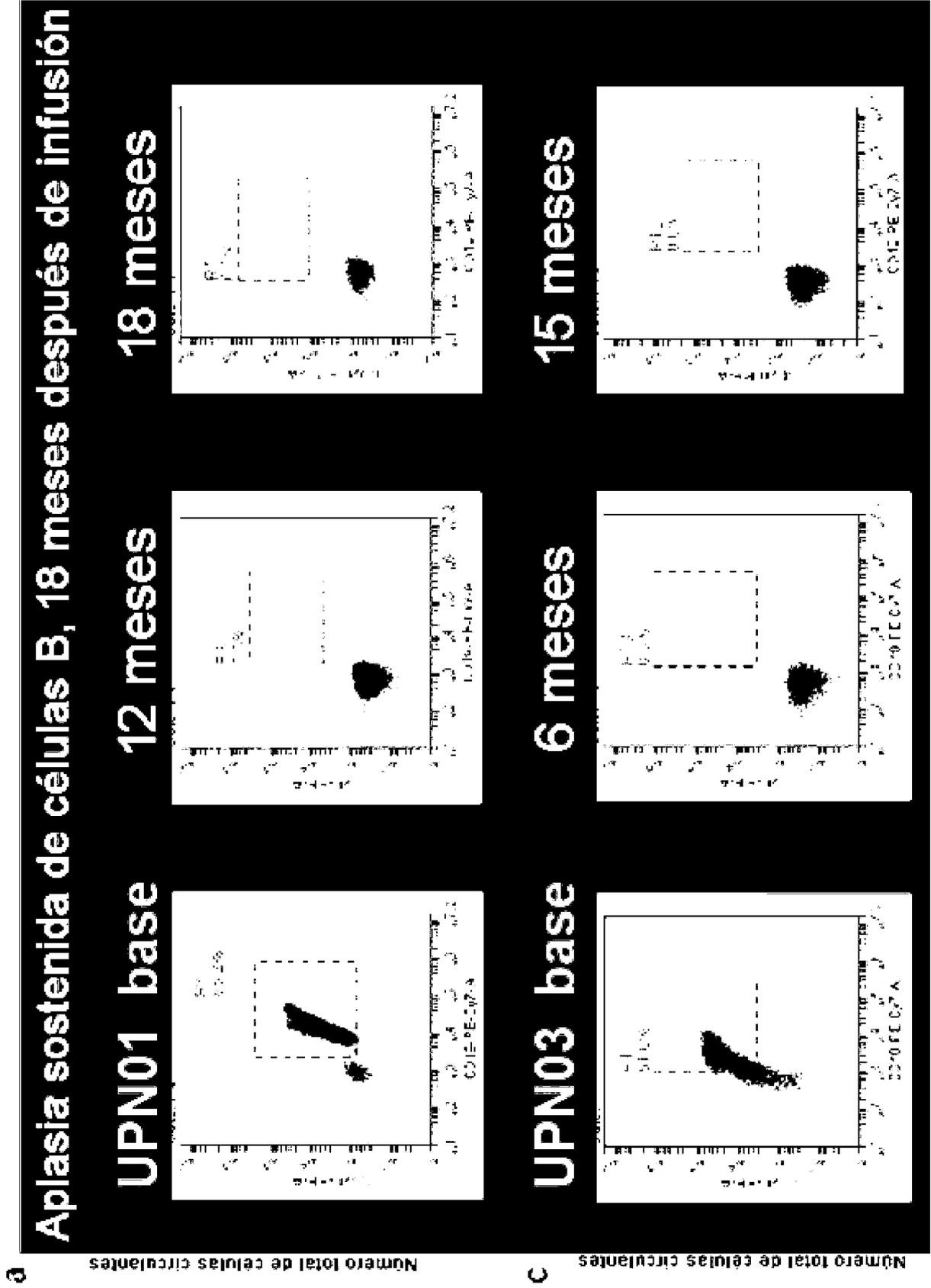


Figura 9 A

Secuenciación profunda para detectar células residuales de LLC y células B

ID paciente	Punto temporal	Cantidad de ADN en PCR (ng)	Equivalentes celulares	Total de lecturas de secuencia productoras	Total de clonotipos únicos productores	Lecturas de clon dominante	Frecuencia de clones (% productores)
UPN03	Pre-Infusión	2,000	317,460	22,074,912	58,234	19,948,508	90.4
03	Día -1	386	61,270	1,385,340	4,544	1,231,018	88.9
03	D+31	1,000	158,730	0	0	0	0.000
03	D+176	2,000	317,460	0	0	0	0.000
UPN01	Pre-Infusión	1,000	158,730	184,786	24	184,256	99.7
01	Día -1	1,000	158,730	408,579	48	407,592	99.8
01	D+28	1,000	158,730	0	0	0	0.000
01	D+176	500	79,365	285,305	7,362	0	0.000

Figura 9B

Reducción del número de células plasmáticas tras la terapia de CART19

Porcentajes de células plasmáticas de médula ósea en pacientes UPN01, UPN02 y UPN03.

El número de células plasmáticas se enumeró en el laboratorio clínico mediante inmunohistoquímica de CD138 realizada en biopsias representativas de núcleo de médula ósea. ND: no determinado, el espécimen era inadecuado. Los porcentajes indicados son estimaciones determinadas mediante una evaluación de una sección entera de médula ósea. En UPN01, no se identificó ninguna célula CD138⁺ después de la infusión, mientras que en UPN02 y en UPN03, se encontraban presentes células CD138⁺ residuales después de la infusión, a niveles inferiores que en las médulas óseas previas a la infusión.

Paciente	Días después de infusión de células T	% células plasmáticas (CD138 ⁺)
UPN 01	-23	1%
	+39	0%
	+116	0%
	+174	0%
UPN 02	-45	2-3%
	-3	2-3%
	+193	1%
UPN 03	-3	3-5%
	+21	1-2%
	+174	1-2%

Figura 10