



MD/EP 3914611 T2 2025.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3914611 (13) T2

(51) Int. Cl.:C07K 14/725 (2006.01.01)
A61K 35/17 (2015.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2021 1140 (22) Data de depozit: 2020.01.20 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european:20701871.4, 2020.01.20 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european:3914611, 2021.12.01 (31) Numărul cererii prioritare: 201900858; 201962951770 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2019.01.22; 2019.12.20 (33) Țara cererii prioritare: GB; US	(49) Data publicării traducerii fascicului de brevet european validat: BOPI nr. 02/2025, 2025.02.28 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 34/2024, 2024.08.21 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 12/2021, 2021.12.31
(71) Solicitant: INSTIL BIO (UK) LIMITED, GB (72) Inventatori: BRIDGEMAN John, GB; HAWKINS Robert, GB (73) Titular: INSTIL BIO (UK) LIMITED, GB (74) Mandatar autorizat: CORCODEL Angela	

(54) Receptori care furnizează costimulare țintită pentru terapia celulară adoptivă

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o celulă care cuprinde un receptor himeric de antigen costimulator (CoStAR) util în terapia celulară adoptivă (ACT). CoStAR poate acționa ca un modulator al răspunsurilor de îmbunătățire a activității celulare la antigeni definiți. Prezenta invenție furnizează, de asemenea, proteine CoStAR, acizi nucleici care codifică CoStAR și utilizări terapeutice ale acestora.

Secvențe: 13

Revendicări: 21

Figuri: 10

MD/EP 3914611 T2 2025.02.28

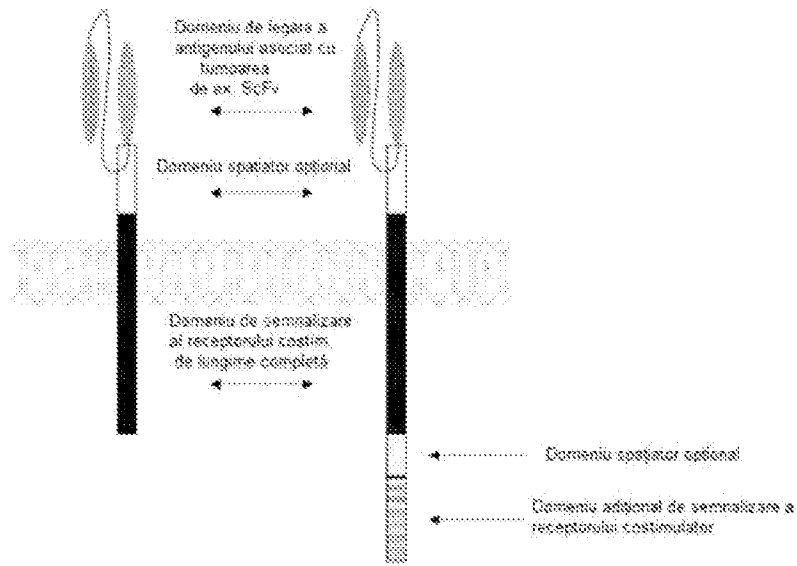


Fig. 1

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de titular)****EXPUNEREA SECVENȚELOR**

5 Cererea de față conține o listare a secvențelor, care a fost depusă electronic și este prin aceasta încorporată prin referință în întregime.

DOMENIUL INVENȚIEI

10 Invenția de față se referă la o celulă care cuprinde un receptor al unui antigen costimulator himeric (CoStAR) util în terapia celulară adoptivă (ACT). CoStAR poate acționa ca modulator al activității celulare, intensificând răspunsurile la antigeni definiți. Invenția de față furnizează de asemenea proteine CoStAR, acizi nucleici care codifică CoStAR și utilizări terapeutice ale acestora.

FONDUL INVENȚIEI

15 Terapia celulară adoptivă (ACT) utilizând celule T pentru a media regresia cancerului a prezentat multe promisiuni în studiile clinice timpurii. Câteva abordări generale au fost adoptate, cum ar fi utilizarea de limfocite reactive la tumoare naturale sau limfocite infiltrante în tumoare (TIL), extinse in vivo. În plus, celulele T pot fi modificate genetic pentru a le re-ținti către antigeni tumorali definiți. Aceasta poate fi realizată prin transferul genic al receptorilor celulelor T (TCR) specifici complexului de histocompatibilitate (p)-major (MHC), sau fuziuni sintetice dintre fragmentul de anticorp monocatenar specific pentru tumoare (scFv) și domeniile de semnalizare ale celulelor T (de ex. CD3ζ), ultimele fiind

20 denumite receptori ai antigenilor himerici (CAR).

Transferul TIL și TCR s-a dovedit în special bun atunci când s-a țintit melanomul (Rosenberg et al. 2011; Morgan 2006), în timp ce terapia CAR s-a arătat mult mai promițătoare în tratamentul malignităților celulelor B (Grupp et al. 2013).

25 Succesul terapiei CAR în leucemie a fost atribuit parțial încorporării domeniilor costimulatoare (de ex. CD28 sau CD137) în constructul CAR, ale căror semnale sunt sinergice cu semnalul furnizat de CD3ζ pentru a intensifica activitatea anti-tumorală. Baza pentru această observație se referă la paradigma clasică semnal 1/semnal 2 a activării celulelor T. Aici, semnalul 1, furnizat de complexul TCR, este sinergic cu semnalul 2 furnizat de receptori costimulatori, cum ar fi CD28, CD137 sau CD134, pentru a permite celulelor să sufere extinderea clonală, producția de IL2 și supraviețuirea pe termen lung fără activarea morții celulare induce (AICD) asociate doar cu semnalul 1. În plus, implicarea semnalului 2 intensifică semnalul generat prin semnalul 1, permițând celulelor să răspundă mai bine interacțiunilor cu aviditate scăzută, cum ar fi cele întâlnite în timpul răspunsurilor anti-tumorale.

30 Co-stimularea țintită va avea efecte benefice pentru terapiile celulare T care nu se bazează pe CAR. De exemplu, incorporarea de domenii co-stimulatoare într-un TCR himeric s-a arătat că intensifică răspunsurile celulelor T față de pMHC (Govers 2014). În timp ce limfocitele infiltrante în tumoare (TIL-urile) își utilizează TCR endogeni pentru a media recunoașterea tumorii, nu a fost posibilă manipularea TCR endogeni. Astfel, TIL sunt supuse unor limitări substanțiale, deoarece celulele tumorale exprimă foarte puțini liganzi costimulatori. Capacitatea de a induce costimularea țintită a TIL, sau într-adevăr a oricărui produs de terapie celulară T adoptivă, ar fi benefică.

REZUMATUL INVENȚIEI

40 CoStAR-ii și celulele care cuprind sau care exprimă CoStAR-i, așa cum au fost descriși aici, sunt benefici pentru terapiile care nu se bazează pe CAR, și care se bazează pe CAR, deopotrivă. Invenția de față utilizează celule în conformitate cu revendicarea 10, care exprimă un nou receptor costimulator himeric în conformitate cu revendicarea 1, pentru a furniza un semnal costimulator celulelor T după angajarea cu un antigen definit asociat cu o boală, de exemplu asociat cu o tumoare. Au existat câteva comunicări în care semnalul 1 și semnalul 2 împărțite au fost utilizate pentru a dirija răspunsurile specifice pentru antigen în celulele T manipulate (Alvarez-Vallina & Hawkins 1996). Cu toate acestea, nici una nu a utilizat molecula CD28 de lungime completă. Există câteva avantaje specifice la utilizarea receptorilor de lungime completă, cum ar fi CD28, în opoziție cu formele trunchiate. CD28 de lungime completă este dimer, permițând ca receptorul să funcționeze în forma nativă a acestuia; într-adevăr, receptori antigenului himeric nu pot funcționa optim atunci când sunt exprimați sub formă de monomer (Bridgeman et al. 2010). Invenția furnizează de asemenea un receptor costimulator țintit în conformitate cu revendicarea 1, care induce semnalul 2 după angajarea cu un antigen asociat cu un cancer, sau asociat cu o tumoare. Molecula de CD28 de lungime completă conține motive critice pentru funcția nativă a acesteia de a lega membri ai familiei de receptori B7; deși acest fapt este potențial periculos din perspectiva CAR care poartă receptori CD28 și CD3ζ în tandem, în care legarea CAR de către B7 ar putea declanșa activarea celulelor T, există calități benefice pentru receptori care poartă doar receptori semnalului 2.

50

55

Inventatorii de față au arătat că limfocitele T (celulele T), pot fi manipulate pentru a exprima un CoStAR (receptor costimulator al unui antigen), pentru a augmenta activarea celulelor T după angajarea

cu un antigen asociat cu o tumoare definită. Inventatorii arată că activarea celulelor T, așa cum a fost măsurată prin secreția de IFN γ și IL-2, de un mitogen de semnal 1 (OKT3), este intensificată atunci când celulele manipulate sunt de asemenea lăsate să primească semnalul 2 prin CoStAR după angajarea cu antigenul CEA asociat cu tumoarea. Astfel, într-un prim aspect, invenția de față furnizează un receptor

costimulator recombinat al unui antigen (CoStAR) în conformitate cu revendicările precedente.

CoStAR este proiectat astfel încât legarea CoStAR la antigenul tumoral desemnat al acestuia să aibă ca rezultat activarea receptorului, și furnizează un semnal costimulator pentru a augmenta semnalele concurente mediate de semnalul 1 furnizate printr-un TCR recombinat, receptor de antigen himeric (CAR), sau TCR endogen. Antigenul tumoral poate fi un antigen asociat cu tumoarea, cum ar fi cei din familia de

molecule de antigeni de cancer testicular sau onco-fetal, cum ar fi CEA sau 5T4, și țintirea utilizând un fragment de anticorp cu o singură catenă. Ca alternativă, antigenul tumoral poate fi prezentat sub formă de peptidă prin MHC, și țintit utilizând un fragment de anticorp monocatenar specific pMHC sau TCR monocatenar.

În anumite aranjamente descrise aici, domeniul de semnalizare cuprinde un receptor costimulator de lungime completă (întreaga secvență de proteină, fără peptida de semnal), incluzând, dar nelimitându-se la, CD2, CD9, CD26, CD27, CD28, CD29, CD38, CD40, CD43, CD46, CD49d, CD55, CD73, CD81, CD82, CD99, CD100, CD134 (OX40), CD137 (41BB), CD150 (SLAM), CD270 (HVEM), CD278 (ICOS), CD357 (GITR), sau EphB6. În invenția de față, CoStAR cuprinde un prim segment intracelular cuprinzând un domeniul de semnalizare intracelular al CD28, și un al doilea segment intracelular, cuprinzând un

domeniu de semnalizare intracelular al CD40.

Domeniul costimulator poate consta doar dintr-un domeniu de receptor, sau multiplu în tandem (adică, un receptor de fuziune), în care fiecare domeniu este legat direct sau printr-un linker flexibil de până la 50 de aminoacizi lungime. În anumite variante de realizare, domeniul de semnalizare cuprinde un fragment al unui receptor costimulator de lungime completă, în care fragmentul este eficace pentru dimerizare. Poate exista un linker care leagă fragmentul de anticorp cu lanț unic la domeniul de semnalizare. Acest linker, dacă este prezent, poate avea o lungime de 1-50 de aminoacizi. Limfocita poate fi o celulă T, incluzând o limfocită care se infiltrează într-o tumoare (TIL), o celulă T reglatoare (Treg), sau o celulă T primară, sau o celulă NK. În plus față de CoStAR, limfocita, celula T sau celula NK pot include un receptor recombinat al celulei T (TCR) sau un receptor himeric al unui antigen (CAR).

Un individ cu suficientă experiență știe că identificarea punctului exact la care peptida de semnal este clivată din proteina matură este dificil de determinat cu acuratețe, și deși poate fi aplicat un software de predicție, matisarea (splicing) artificială a secvențelor din amonte proteinei mature poate crea noi situsuri pentru peptidazele de peptidă de semnal, astfel termenul „lungime completă” din acest document implică proteina matură cu deleții sau mutații de până la 5 aminoacizi chiar la capătul N terminal al proteinei mature, un proces critic pentru matisarea optimă a domeniului costimulator într-un receptor himeric. Aceasta este o distincție clară de secvențele anterioare publicate, cum ar fi cele utilizate în Lanitis et al (2013), unde doar domeniul intracelular al CD28 a fost utilizat, cu utilizarea unui domeniu transmembrantar al CD28, și în Krause et al. (1998), în care a fost utilizat un domeniu al unui receptor CD28 trunchiat, care a fost trunchiat la motivul IEV.

Se descrie de asemenea aici o secvență de acizi nucleici care codifică CoStAR așa cum a fost descris mai sus și aici.

Se descrie de asemenea aici un vector care cuprinde o secvență de acizi nucleici în conformitate cu secvența de acid nucleic care codifică CoStAR și, dacă este prezentă, o secvență de acizi nucleici al TCR și/sau al CAR.

Se descrie de asemenea aici o metodă de fabricare a unei limfocite, sau a unei celule T sau NK, în conformitate cu dezvăluirea de aici, care cuprinde etapa de introducere a unui acid nucleic care codifică CoStAR sau a vectorului în limfocită.

Se descrie de asemenea aici o compoziție farmaceutică care cuprinde un vector în conformitate cu ceea ce a fost dezvăluit aici, sau o limfocită (incluzând o celulă T sau NK) în conformitate cu ceea ce a fost dezvăluit aici, împreună cu un purtător, diluant sau excipient farmaceutic acceptabil, precum și utilizările terapeutice ale acesteia.

Se descrie de asemenea aici o celulă, de ex. o limfocită, incluzând o celulă T sau NK, în conformitate cu ceea ce a fost dezvăluit aici, sau un vector în conformitate cu ceea ce a fost dezvăluit aici, incluzând pentru utilizare în terapie celulară adoptivă.

Se descrie de asemenea aici o limfocită, incluzând o celulă T sau NK, în conformitate cu ceea ce a fost dezvăluit aici, sau un vector în conformitate cu ceea ce a fost dezvăluit aici, incluzând pentru utilizare într-o metodă de tratare a cancerului.

Se descrie de asemenea aici utilizarea unei limfocite în conformitate cu ceea ce a fost dezvăluit aici, sau utilizarea vectorului în conformitate cu ceea ce a fost dezvăluit aici, în fabricarea unui medicament pentru tratarea cancerului.

Se descrie de asemenea aici o limfocită în conformitate cu ceea ce a fost dezvăluit aici, un vector în conformitate cu ceea ce a fost dezvăluit aici sau o compoziție farmaceutică așa cum a fost dezvăluită aici, pentru utilizare în tratamentul cancerului.

În anumite aranjamente descrise aici, receptorul CoStAR cuprinde un receptor CD28 de lungime completă așa cum a fost definit aici. În unele aranjamente (dar nu revendicate toate), CoStAR cuprinde un domeniu de legare a antigenului asociat cu tumoarea, fuzionat cu: un domeniu de semnalizare de fuziune cuprinzând sau constând din, CD28 umană de lungime completă, cum ar fi cea arătată în SEQ ID NO:2 sau o variantă a acestuia având cel puțin 80% identitate a secvenței la nivel de secvență; și un alt fragment selectat dintre: domeniul intracelular de la CD137 uman, cum ar fi cel arătat în SEQ ID NO:4 sau o variantă a acestuia având cel puțin 80% sau 90% identitate a secvenței la nivel de secvență; domeniul intracelular de la CD134 uman, cum ar fi cel arătat în SEQ ID NO:5 sau o variantă a acestuia având cel puțin 80% sau 90% identitate a secvenței la nivel de secvență; domeniul intracelular de la CD2 uman, cum ar fi cel arătat în SEQ ID NO:6 sau o variantă a acestuia având cel puțin 80% sau 90% identitate a secvenței la nivel de secvență; domeniul intracelular de la CD29 uman, cum ar fi cel arătat în SEQ ID NO:7 sau o variantă a acestuia având cel puțin 80% sau 90% identitate a secvenței la nivel de secvență; domeniul intracelular de la GITR uman, cum ar fi cel arătat în SEQ ID NO:8 sau o variantă a acestuia având cel puțin 80% sau 90% identitate a secvenței la nivel de secvență; domeniul intracelular de la IL2Ry uman, cum ar fi cel arătat în SEQ ID NO:9 sau o variantă a acestuia având cel puțin 80% sau 90% identitate a secvenței la nivel de secvență; domeniul intracelular de la CD40 uman, cum ar fi cel arătat în SEQ ID NO: 10 sau o variantă a acestuia având cel puțin 80% sau 90% identitate a secvenței la nivel de secvență; domeniul intracelular de la CD150 umană, cum ar fi cel arătat în SEQ ID NO: 11 sau o variantă a acestuia având cel puțin 80% sau 90% identitate a secvenței la nivel de secvență sau domeniul intracelular de la CD2 umană și de la CD40 umană, cum ar fi cel arătat în SEQ ID NO: 12 sau o variantă a acestuia având cel puțin 80% sau 90% identitate a secvenței la nivel de secvență. Într-o variantă de realizare a invenției de față, un CoStAR cuprinde: (i) un domeniu de semnalizare cuprinzând sau constând din CD28 umană de lungime completă cu SEQ ID NO:2 sau o variantă a acesteia având cel puțin 80% identitate a secvenței la nivel de secvență în care menționata CD28 umană de lungime completă nu cuprinde peptida de semnal și opțional nu are până la 5 aminoacizi de la capătul N terminal al proteinei receptor mature odată ce peptida de semnal a acestuia a fost clivată; și (ii) domeniul intracelular de la CD40 umană așa cum a fost arătat în SEQ ID NO: 10, sau o variantă a acestuia având cel puțin 80% sau 90% identitate a secvenței la nivel de secvență, în care domeniul intracelular de la CD40 umană sau o variantă a acestuia are activitate funcțională ca domeniu de semnalizare intracelulară a CD40. În unele aranjamente, varianta uneia dintre fragmentele descrise mai sus nu are 1, 2, 3, 4, sau 5 sau până la 10 resturi de aminoacizi N terminali cu referire la o secvență de fuziune listată mai sus.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Următoarea descriere detaliată, dată ca exemplu, dar care nu intenționează să limiteze invenția doar la variantele de realizare specifice descrise, poate fi înțeleasă împreună cu desenele însoțitoare.

Figura 1 - Organizarea structurală a receptorilor costimulatori unici și cu domeniu costimulator de fuziune. O reprezentare schematică a receptorilor CoStAR prezentată în revendicări este arătată. Întâi, un CoStAR bazat pe un singur receptor costimulator, și în al doilea rând, un CoStAR constând dintr-un domeniu de semnalizare al receptorului costimulator fuzionat cu un al doilea domeniu costimulator.

Figura 2 – Organizarea genomică a configurațiilor CoStAR potențiale – CoStAR constă dintr-un domeniu de legare a antigenului, un domeniu spațiator opțional și un domeniu costimulator așa cum a fost arătat în figură și descris în revendicări. CoStAR poate fi exprimat: A) singur dintr-un promotor, cu CoStAR constând din un singur receptor costimulator (Ai), sau dintr-un receptor costimulator de fuziune (Aii); B) poate fi exprimat cu o etichetă de epitop (de ex. His tag, DYKDDDDK (SEQ ID NO: 14) etc.) la capetele N sau C terminal, pentru a permite colorarea directă a CoStAR; C) împreună cu o genă marker separată utilizând o secvență de clivaj 2A sau un situs de intrare ribozomal intern (IRES); D) împreună cu o genă marker care este exprimată dintr-un al doilea promotor; E) împreună cu o proteină de interes, cum ar fi un receptor de antigen himeric sau un receptor al celulei T separate utilizând o secvență de clivaj 2A sau un situs de intrare ribozomal intern (IRES); F) împreună cu o proteină de interes, cum ar fi un receptor al unui antigen himeric sau un receptor al celulei T, care este exprimat dintr-un al doilea promotor. Ar fi clar pentru un individ cu suficiente cunoștințe că CoStAR și gena marker/receptorul antigenului himeric/receptorul celulei T/altă proteină de interes ar putea fi exprimate în orice orientare, sau în 3' (3-prim) sau în 5' (5-prim) unul față de celălalt.

Figura 3 – Activitatea funcțională a CoStAR în celulele T ca răspuns la antigenul prezentat pe tumorile LS174T și LoVo. Populațiile de celule T donoare normale de la donatorul 1 (A & D), donatorul 2 (B) și donatorul 3 (C & E) au fost manipulate lentiviral pentru a exprima CoStAR, care țintește antigenul carcino-embriionar, și sortate magnetic pentru fiecare transgenă utilizând selecția magnetică a CD34. Celulele T au fost amestecate cu celule tumorale CEA+ nemanipulate de tip sălbatic (tumoare neactivatoare) sau cu celule tumorale CEA+ manipulate pentru a exprima un fragment de anticorp monocatenar anti-CD3 ancorat la suprafața celulară (tumoare activatoare) la rapoartele indicate dintre efector și țintă, și IL-2 măsurată în supernatant prin ELISA. Datele obținute utilizând celule LS174T (A, B & C) și LoVo (D & E).

Figura 4 - Efectul CoStAR asupra proliferării celulelor T. 5×10^5 celule T transduse și netransduse au fost amestecate cu $6,25 \times 10^3$ de celule LoVo de tip sălbatic sau LoVo-OKT3 în prezență de (A), sau în absență de (B) IL-2, și numărul de celule a fost determinat după trei zile. Într-o altă analiză cu aceleași rapoarte de celule, celule T de la doi donori au fost încărcate cu colorant de proliferare, și numărul de cicluri de proliferare prin care celulele au trecut, a fost determinat prin diluarea colorantului după șase zile, utilizând citometrie în flux.

Figura 5 – Activitatea IL-2 a receptorilor de fuziune CoStAR în celule T umane primare. Celule T CD8+ donoare normale de la șapte donori (cu excepția CoStAR martor de la trei donori), au fost transduse lentiviral cu trei CoStAR care țintesc CEA, și producția de IL-2 a fost evaluată după o stimulare peste noapte în prezență de celule LoVo-OKT3. Producția de celule pozitive față de IL-2 a fost determinată utilizând colorarea în flux intracelulară atât în populația CD34 negativă (CoStAR netransdusă), cât și în populația CD34+ (CoStAR transdusă). Asteriscurile arată diferențele semnificative dintre populații utilizând testul rangului semnat Wilcoxon, cu $*p < 0,05$

Figura 6A-6D – Analiza multi-parametru a activității CoStAR în celulele T umane primare. Celule T CD8+ donoare normale au fost transduse lentiviral cu CoStAR indicați care țintesc CEA, și producția de IL-2 a fost evaluată după o stimulare peste noapte în prezență de celule LoVo-OKT3. Proportia de celule pozitive față de IL-2 (șapte donori) (Fig. 6A), IFN γ (șapte donori) (Fig. 6B), bcl-xL (cinci donori) (Fig. 6C) și CD107a (șase donori) (Fig. 6D) a fost determinată utilizând colorarea în flux intracelulară a populațiilor CD34 negative (CoStAR netransdusă) și CD34+ (CoStAR transdusă). Martorul este CoStAR care țintește CA125 și este de la trei donori în toate cazurile. Hărțile de căldură sunt medii ale tuturor donurilor, cu intensitatea culorii asociată cu procentul de celule pozitive pentru o citire particulară în condițiile definite.

Figura 7 - CD40 intensifică producția de IL-2 de la CoStAR pe bază de CD28. Celule T umane primare de la trei donori sănătoși au fost lăsate netransduse, sau au fost transduse cu CD28 cu domeniul extracelular trunchiat (Tr CD28), CD28 de lungime completă (FL CD28), sau cu CD28. CoStAR pe bază de CD40 care poartă un scFv specific pentru CEA (MFE23). Celulele transduse au fost selectate utilizând o genă marker CD34 și extinse înainte de analiză. Celulele T au fost amestecate la un raport efector la țintă de 8:1, cu celule LoVo CEA+ care exprimă OKT3 timp de 20 de ore înainte de analiza producției de IL-2 prin ELISA.

Figura 8 - Efectul domeniului de semnalizare și antigenului țintă asupra expansiunii celulelor T mediate de CoStAR. Celulele T au fost transduse fie cu CoStAR-i pe bază de CD28 cu etichetă de epitop DYKDDDK (SEQ ID NO:14), sau de CD28.CD40, care poartă scFv specofoc pentru CA125, FolR sau CEA, sau peptida de legare specifică a FolR. Celulele T au fost amestecate cu linia de celule OVCAR3 CA125+/FolR+/CEA care exprimă OKT3. Numărul de celule transduse a fost numărat la fiecare de la 7 zile la 21 de zile, cu celule OVCAR3 proaspete adăugate după fiecare numărătoare.

Figura 9 - (de la A la I). Efectul domeniului de semnalizare și al antigenului țintă asupra expansiunii celulelor T mediate de CoStAR. Celulele T au fost transduse cu CoStAR pe bază de CD28.CD40 sau de CD28 etichetat cu epitopul DYKDDDDK (SEQ ID NO: 14), care poartă scFv specific pentru CA125, FolR sau CEA, sau peptida de legare specifică (C7) pentru FolR. Celulele T au fost amestecate cu linia de celule OVCAR3 CA125+/FolR+/CEA care exprimă OKT3. Numărul de celule transduse a fost numărat la de la fiecare 7 zile la 21 de zile, cu celule OVCAR3 proaspete adăugate după fiecare numărătoare.

Figura 10 - (A și B) CoStARN pe bază de CD40 intensifică stimularea celulelor T într-un model de transfer TCR. Celule umane primare T de la trei donori sănătoși au fost transduse cu un TCR specific pentru CEA plus CoStAR pe bază de CD28 etichetat cu DYDDDK sau de CD28.CD40 care poartă scFv-uri specifice pentru MFE, (cercurile goale sau pline), sau pentru CA125 (pătratele goale). Celulele T au fost amestecate la un raport dintre efector și țintă de 1:1 cu celule H508 CEA+/CA125- și colorarea intracelulară pentru citokine a fost executată pentru a determina numărul de celule T CD4+ sau CD8+ care răspund din populațiile de TCR+/CoStAR+, TCR+/CoStAR-, TCR-/CoStAR+ și TCR-/CoStAR-. O ANOVA cu două căi (testul Tukey) a fost executată pentru a determina diferențele semnificative ale activității: $*p > 0,05$, $**p > 0,01$, $***p > 0,001$, $****p > 0,0001$.

DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

Doar dacă nu a fost definit altceva, toți termenii tehnici și științifici utilizați aici au aceeași semnificație ca cea care este înțeleasă în mod obișnuit de un specialist din domeniu, căruia această invenție îi aparține.

RECEPTORUL DE ANTIGEN COSTIMULATOR (CoStAR)

Se furnizează aici receptori de antigen costimulatori recombinanți (CoStAR) cuprinzând: (i) un domeniu de legare a antigenului asociat cu o boală (în revendicări, cancerul), sau asociat cu o tumoră; și (ii) un segment de legare a ligandului extracelular al unei proteine receptor stimulator, și (iii) un prim segment intracelular cuprinzând un domeniu de semnalizare intracelular al unei proteine receptoare, și (iv) opțional (dar în invenția nerevendicată, neopțional), un al doilea segment intracelular cuprinzând un domeniu de semnalizare intracelular al unei a doua proteine receptoare. În invenția de față, CoStAR este așa cum a fost definit în revendicarea 1. În anumite aranjamente (și după cum a fost revendicat), segmentul extracelular și primul segment intracelular cuprind segmente ale aceleiași proteine receptoare. În anumite aranjamente (nerevendicat), segmentul extracelular și primul segment intracelular cuprind segmente de la proteine receptoare diferite. În anumite aranjamente, există un domeniu transmembrantar de intervenție între un segment extracelular și primul segment intracelular. Aranjamente care cuprind un al doilea segment intracelular opțional și/sau un al treilea segment intracelular opțional pot cuprinde suplimentar spațiatori între segmentele intracelulare. Într-o formă simplă, un CoStAR așa cum a fost descris aici cuprinde un fragment de anticorp monocatenar (scFv) fuzionat cu CD28 de lungime completă, care transmite un semnal costimulator dependent de angajarea scFv-ului cu antigenul înrudit al acestuia și/sau de angajarea CD28 cu ligandul înrudit al acestuia. După cum se utilizează aici, „proteină de lungime completă” sau „receptor de lungime completă”, se referă la o proteină receptoare, cum ar fi, de exemplu, o proteină receptoare CD28. Termenul „lungime completă” cuprinde proteinele receptoare care nu au de la 5 aminoacizi până la 10 aminoacizi, de exemplu 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, sau 10 aminoacizi, de la capătul N terminal al proteinei receptor mature odată ce peptida de semnal a acestuia a fost clivată. De exemplu, în timp ce un situs de clivaj specific al unei peptide de semnal N terminale a receptorului poate fi definit, variabilitatea în punctul exact de clivaj a fost observată. Termenul „lungime completă” nu implică prezența sau absența aminoacizilor receptorilor peptidei de semnal N terminale. Într-un aranjament, termenul „lungime completă” (de ex. CD28 de lungime completă în conformitate cu anumite dezvoltări de aici), cuprinde proteinele de receptor mature (de ex. CD28 în conformitate cu anumite dezvoltări de aici) care nu au peptida de semnal N terminal care nu are până la aproximativ 5, de exemplu 1, 2, 3, 4, 5, sau până la 10 aminoacizi de la capătul N terminal al proteinei receptor mature odată ce peptida de semnal a acesteia a fost clivată. SEQ ID NO. 2 arată proteina CD28 matură, incluzând peptida de semnal. După cum a fost menționat mai sus, un receptor CD28 de „lungime completă” în conformitate cu diferitele aranjamente descrise aici, nu include peptida de semnal, și poate să nu aibă până la aproximativ 5, de exemplu 1, 2, 3, 4, 5, sau până la 10 aminoacizi de la capătul N terminal al proteinei receptor mature (de ex. resturile N terminale N, K, I, L și/sau V). Acest fapt este arătat în fuziunile exemplare, de ex. în SEQ ID No. 4-12 (observați că acestea pot să nu aibă până la aproximativ 5, de exemplu 1, 2, 3, 4, 5, sau până la 10 aminoacizi de la capătul N terminal al proteinei receptor mature așa cum a fost arătat în regiunea încadrată).

CoStAR au o formă modulară, și pot fi construiți pentru a cuprinde domeniile extracelular, transmembrantar și intracelular obținute de la una sau mai multe proteine, împreună cu scFv obținut de la un anticorp care se leagă la un antigen asociat cu o boală, de exemplu cu un antigen asociat cu o tumoră.

Așa cum a fost descris aici, un CoStAR cuprinde un receptor de antigen asociat cu o boală, de exemplu asociat cu o tumoră, cum ar fi, dar nelimitându-se la, un scFv specific pentru un antigen asociat cu o tumoră, și o proteină costimulatoare primară care este capabilă de a se lega la ligandul înrudit al acesteia și de a furniza un semnal intracelular. În anumite aranjamente, receptorul costimulator primar poate fi o proteină cu o lungime mai puțin decât completă, dar este suficient pentru a lega ligandul înrudit și a transduce un semnal. În anumite aranjamente, domeniul receptorului costimulator este de lungime completă, cum ar fi, dar nelimitându-se la, CD28 de lungime completă. Astfel, atât domeniul de legare specific pentru antigen, cât și receptorul specific pentru ligand, sunt capabili de a lega un antigen înrudit, și un ligand înrudit, în mod corespunzător. Figura 1 ilustrează două aranjamente ale construcțiilor CoStAR. Ambii CoStAR cuprind un domeniu de legare a antigenului, un spațiator opțional, și o proteină receptor costimulator de lungime completă cuprinzând un segment de legare a ligandului și un domeniu de legare a antigenului, și un domeniu de semnalizare intracelulară. Într-un alt aranjament, un CoStAR cuprinde un domeniu de legare a antigenului, un spațiator opțional, o porțiune de legare a ligandului extracelulară a unei proteine receptoare costimulatoare, un domeniu transmembrantar, și un domeniu de semnalizare intracelular al unei a doua proteine receptor costimulator diferite. În anumite aranjamente, porțiunea extracelulară de legare a ligandului cuprinde o trunchiere CD28, de exemplu, o trunchiere CD28 C terminală după aminoacizii IEV ca în SEQ ID NO: 13 și este urmară de un domeniu de semnalizare intracelular. În anumite

aranjamente, domeniul de semnalizare intracelular este de la CD40. Transmembrana care separă domeniile de semnalizare extracelular și de semnalizare intracelular pot fi de la, cu limitare, CD28, CD40. Prin comparația cu constructul din stânga al figurii 1, constructul din figura 1 cuprinde suplimentar un al doilea domeniu de semnalizare al receptorului intracelular și un spațiator opțional. În aranjamente suplimentare, CoStAR-ii pot cuprinde domenii costimulatoare adiționale, de exemplu un al treilea domeniu de semnalizare intracelular costimulator, și din acest punct de vedere poate fi similar cu anumiți receptori de antigen himeric (CAR), care au fost clasificați în de primă generație (doar CD3ζ), a doua generație (un domeniu costimulator + CD3ζ), sau a treia generație (mai mult de un domeniu costimulator + CD3ζ).

Proteinele receptor costimulator utile în CoStAR-ii din dezvăluirea de față includ, fără limitare, CD2, CD9, CD26, CD27, CD28, CD29, CD38, CD40, CD43, CD46, CD49d, CD55, CD73, CD81, CD82, CD99, CD100, CD134 (OX40), CD137 (41BB), CD150 (SLAM), CD270 (HVEM), CD278 (ICOS), CD357 (GITR), sau EphB6, care, sub forma naturală a acestora, cuprind domenii extracelulare de legare a ligandului și domenii de transducție intracelulare a semnalului. În invenția de față, se utilizează CD28 și CD40. De exemplu, CD2 este caracterizată ca moleculă de adeziune a celulei găsită pe suprafața celulelor T, și este capabilă de a iniția semnalele intracelulare necesare pentru activarea celulelor T. CD27 este caracterizată ca glicoproteină transmembranară de tip II, care aparține superfamiliei TNF (TNFSF), a cărei exprimare pe celulele B este indusă de activarea antigen-receptor în celulele B. CD28 este una dintre proteinele de pe celulele T, și este receptorul pentru liganzii CD80 (B7.1) și CD86 (B7.2) de pe celulele care prezintă antigeni. Ligandul CD137 (4-1BB) se găsește pe cele mai multe leucocite, și pe unele celule non imune. Ligandul OX4 este exprimat pe multe celule care prezintă antigeni, cum ar fi DC-urile (celulele dendritice), macrofagele și limfocitele B. Într-un aranjament, proteina costimulator receptoare este CD28 de lungime completă, așa cum a fost definită aici.

În aranjamentele descrise aici, un CoStAR poate fi exprimat singur sub controlul unui promotor într-o populație terapeutică de celule care au activitate terapeutică, de exemplu, limfocitele care se infiltrează în tumoare (TIL-uri). Ca alternativă, CoStAR pot fi exprimați împreună cu o transgenă terapeutică, cum ar fi un receptor de antigen himeric (CAR), și/sau un receptor al celulelor T (TCR), de exemplu, așa cum a fost descris în SEQ ID NOS:3-12 (se observă că pot lipsi până la aproximativ 5, de exemplu 1, 2, 3, 4, 5, sau până la 10 aminoacizi la capătul N terminal al proteinei receptoare mature). Astfel, dezvăluirea de față se referă de asemenea la construcții de CoStAR având o secvență așa cum a fost prezentată în oricare dintre secvențele SEQ ID NOS:3-12, incluzând una dintre aceste secvențe care nu are până la aproximativ 5, de exemplu 1, 2, 3, 4, 5, sau până la 10 aminoacizi la capătul N terminal al proteinei receptoare mature). TCR și CAR adecvați sunt bine cunoscuți în literatură, de exemplu TCR specifici pentru HLA-A*02-NYESO-1 (Rapoport et al. Nat Med 2015) sau CAR de fuziune anti-CD19scFv.CD3ζ (Kochenderfer et al. J Clin Oncol 2015), care au fost utilizați cu succes pentru a trata malignitățile de mielom sau ale celulelor B, în mod corespunzător. CoStAR-ii descriși aici pot fi exprimați cu orice CAR sau TCR cunoscuți, furnizând astfel la celulă cu un comutator de creștere care poate fi reglat, pentru a permite expansiunea celulei *in vitro* sau *in vivo*, și un mecanism de activare convențional sub formă de TCR sau de CAR pentru activitatea anti-cancer. Astfel, dezvăluirea de față furnizează o celulă pentru utilizare în terapia celulară adoptivă, cuprinzând un CoStAR așa cum a fost descris aici și un TCR și/sau un CAR care se leagă specific la un antigen asociat cu o tumoare. Un CoStAR exemplar cuprinzând CD28 include un domeniu de legare a antigenului extracelular, și un domeniu de semnalizare extracelular, un domeniu de semnalizare transmembranar, și un domeniu de semnalizare intracelular, care cuprind secvența de aminoacizi prezentată sub forma SEQ ID NO:2.

Termenul "domeniu de legare a antigenului" așa cum se utilizează aici, se referă la un fragment de anticorp incluzând, dar nelimitându-se la, un diacorp, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un fragment Fv, un fragment Fv stabilizat disulfuric, un (dsFv)₂, dsFv (dsFv-dsFv') bispecific, un diacorp stabilizat disulfuric (diacorp ds), o moleculă de anticorp cu o singură catenă (scFv), un dimer scFv (anticorp bivalent), un anticorp multispecific format dintr-o porțiune a unui anticorp cuprinzând una sau mai multe CDR-uri, un anticorp cu domeniu unic camelizat, un nanocorp, un anticorp de domeniu, un anticorp de domeniu bivalent, sau orice fragment de anticorp care se leagă la un antigen dar nu cuprinde o structură de anticorp complet. Un domeniu de legare a antigenului este capabil de a se lega la același antigen la care anticorpul părinte, sau un fragment de anticorp părinte (de ex., un scFv părinte), se leagă. În unele variante de realizare, un fragment de legare a antigenului poate cuprinde una sau mai multe regiuni de determinare a complementarității CDR-uri de la un anticorp uman particular, grefat pe cadre (FR-uri) de la unul sau mai mulți anticorpi umani diferiți.

Domeniul de legare a antigenului poate fi făcut specific pentru orice antigen asociat cu o boală, incluzând, dar nelimitându-se la, antigeni asociați cu tumoarea (TAA) și antigeni asociați cu boli infecțioase. În anumite variante de realizare, domeniul de legare a ligandului este bispecific. Antigenii au fost identificați în cele mai multe dintre cancerele umane, incluzând limfomul Burkitt, neuroblastomul,

melanomul, osteosarcomul, carcinomul celulelor renale, cancerul de sân, cancerul de prostată, carcinomul de plămâni și cancerul de colon. TAA includ, fără limitare, CD19, CD20, CD22, CD24, CD33, CD38, CD123, CD228, CD138, BCMA, GPC3, CEA, receptorul pentru folat (FR α), mesotelina, CD276, gp100, 5T4, GD2, EGFR, MUC-1, PSMA, EpCAM, MCSP, SM5-1, MICA, MICB, ULBP și HER-2. TAA includ suplimentar neoantigenii, complexeii peptidă/MHC, și complexeii HSP/peptidă.

În anumite variante de realizare, domeniul de legare a antigenului cuprinde un receptor al celulelor T sau un fragment de legare a acestora care se leagă la un complex specific pentru tumoare peptidă-MHC. Termenul „receptor al celulelor T”, sau „TCR”, se referă la un receptor heterodimeric compus din lanțuri $\alpha\beta$ sau $\gamma\delta$ care formează perechi pe suprafața unei celule T. Fiecare dintre lanțurile α , β , γ , și δ este compus din două domenii sub formă de Ig: un domeniu variabil (V) care conferă recunoașterea antigenului prin regiunile de determinare a complementarității (CDR-uri), urmat de un domeniu constant (C) care este ancorat la membrana celulară de către o peptidă conectoare, și o regiune transmembranară (TM). Regiunea (TM) se asociază cu subunitățile invariante ale aparatului de semnalizare CD3. Fiecare dintre domeniile V are trei CDR-uri. Aceste CDR-uri interacționează cu un complex între o peptidă antigenică legată la o proteină codificată de complexul de histocompatibilitate major (pMHC) (Davis and Bjorkman (1988) Nature, 334, 395-402; Davis et al. (1998) Annu Rev Immunol, 16, 523-544; Murphy (2012), xix, 868 p.).

În anumite variante de realizare, domeniul de legare a antigenului cuprinde un ligand natural al unei proteine exprimate de tumoare sau de fragmentul de legare a tumorii al acesteia. De exemplu, receptorul 1 al transferinei (TfR1), cunoscut de asemenea și sub denumirea de CD71, este o proteină homodimeră care este un reglator cheie al homeostaziei celulare a fierului și al proliferării celulare. Deși TfR1 este exprimat la nivel scăzut într-o largă varietate de celule, acesta este exprimat la nivele mai mari în celulele care proliferază rapid, incluzând celulele maligne, în care supraexpresia a fost asociată cu prognostic pur. Într-una din variantele de realizare ale invenției, domeniul de legare a antigenului cuprinde transferină sau un fragment de legare a receptorului transferinei al acestuia.

În anumite variante de realizare, domeniul de legare a antigenului este specific pentru un antigen definit asociat cu o tumoare, cum ar fi, dar nelimitându-se la, FR α , CEA, 5T4, CA125, SM5-1 sau CD71. În anumite variante de realizare, antigenul asociat cu tumoarea poate fi un complex peptidă-MHC specific pentru tumoare. În anumite asemenea variante de realizare, peptida este un neoantigen. În alte variante de realizare, antigenul asociat cu tumoarea este un complex de proteină de șoc caloric – peptidă.

În aranjamentele discutate aici, domeniul de semnalizare al domeniului extracelular, transmembranar și intracelular al CoStAR are secvența prezentată în SEQ ID NO: 1.

Așa cum a fost utilizat aici, termenul "se leagă specific" sau "este specific pentru" se referă la interacțiuni măsurabile și reproductibile, cum ar fi legarea dintre o țintă sau un fragment de anticorp, care este determinant pentru prezența țintei în prezența unei populații heterogene de molecule, incluzând moleculele biologice. De exemplu, un fragment de anticorp care se leagă specific la o țintă (care poate fi un epitop), este un fragment de anticorp care se leagă la țintă cu afinitate și aviditate mai mari, mai rapid și/sau cu durată mai îndelungată decât legările acestuia la alte ținte. În unele aranjamente, un fragment de anticorp care se leagă specific la un antigen reacționează cu unul sau mai mulți determinanți ai unui antigen (de exemplu un antigen de suprafață a unei celule sau un complex peptidă/proteină MHC) cu o afinitate de legare care este de cel puțin 10 ori afinitatea de legare a acestuia pentru alte ținte.

DOMENIUL SPAȚIATOR

Un CoStAR așa cum a fost descris aici opțional cuprinde o regiune spațioasă între domeniul de legare a antigenului și receptorul costimulator. După cum se utilizează aici, termenul "spațiator" se referă la regiunea structurală extracelulară a unui CoStAR care separă domeniul de legare a antigenului de domeniul extern de legare a ligandului al proteinei costimulatoare. Spațiatorul furnizează flexibilitate, pentru a accesa antigenul țintă și ligandul de receptor. În anumite aranjamente, se utilizează spațiatori lungi, de exemplu pentru a ținti epitopii apropiați de membrană sau antigenii glicozilați (vezi Guest R.D. et al. The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens. J. Immunother. 2005;28:203-211; Wilkie S. et al., Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor. J. Immunol. 2008;180:4901-4909). În alte aranjamente, CoStAR poartă spațiatori scurți, de exemplu pentru a ținti epitopii distali de membrană (vezi Hudecek M. et al., Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells. Clin. Cancer Res. 2013;19:3153-3164; Hudecek M. et al., The nonsignaling extracellular spațiator domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. Cancer Immunol. Res. 2015;3:125-135). Într-un anumit aranjament, spațiatorul cuprinde toată balamaua IgG, sau o parte a balamalei IgG, sau este derivată de la o balama IgG, incluzând dar nelimitându-se la, IgG1, IgG2, sau IgG4. Prin "derivat de la o balama Ig" se înțelege un spațiator cuprinzând inserții, deleții, sau mutații într-o balama a IgG. În anumite aranjamente, un spațiator poate cuprinde toate domeniile constante ale unuia sau mai multor anticorpi, sau

o parte a acestora, cum ar fi, dar nelimitându-se la, domeniile CH2 și/sau CH3. În anumite aranjamente, într-un spațiator cuprinzând tot domeniul CG2 sau o parte a acestuia, domeniul CH2 este modificat astfel încât să nu se lege la un receptor Fv. De exemplu, legarea receptorilor Fc în celulele mieloide s-a descoperit că deranjează funcționalitatea CAR ai celulelor T. În anumite aranjamente, spațiatorul cuprinde toată CD28, sau o parte de la CD28, sau altă proteină cuprinzând o regiune de balama. În anumite aranjamente care cuprind un spațiator, spațiatorul are o lungime de la 1 și 50 aminoacizi.

DOMENIUL DE SEMNALIZARE

Așa cum a fost discutat mai sus, în anumite aranjamente (nu toate revendicate), un CoStAR cuprinde un receptor costimulator primar de lungime completă, care poate cuprinde un ligand extracelular care leagă, și o porțiune de semnalizare intracelulară a, fără limitare, CD2, CD9, CD26, CD27, CD28, CD29, CD38, CD40, CD43, CD46, CD49d, CD55, CD73, CD81, CD82, CD99, CD100, CD134 (OX40), CD137 (41BB), CD150 (SLAM), CD270 (HVEM), CD278 (ICOS), CD357 (GITR), sau EphB6. În invenția de față, CoStAR cuprinde un ligand extracelular care leagă, și o porțiune de semnalizare intracelulară a, CD28. În alte aranjamente, receptorul costimulator cuprinde o proteină himerică, de exemplu cuprinzând un domeniu de legare a unui ligand extracelular al uneia dintre proteinele mai sus menționate și un domeniu de semnalizare intracelulară a proteinelor mai sus menționate. În invenția de față, CoStAR cuprinde un segment de legare a ligandului extracelular al unui CD28, și un prim segment intracelular, cuprinzând un domeniu de semnalizare intracelular al CD28. În anumite aranjamente (nerevendicate), porțiunea de semnalizare a CoStAR cuprinde un singur domeniu de semnalizare. În alte aranjamente, porțiunea de semnalizare a CoStAR cuprinde un al doilea domeniu de semnalizare intracelular, cum ar fi, dar nelimitându-se la: CD2, CD27, CD28, CD40, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAM). În invenția de față, CoStAR cuprinde un al doilea domeniu de semnalizare intracelular de la CD40. În anumite aranjamente (nerevendicate), primul și al doilea domeniu de semnalizare intracelulare sunt aceleași. În alte aranjamente, primul și al doilea domeniu de semnalizare intracelulare sunt diferite. În invenția de față, CoStAR cuprinde un prim domeniu de semnalizare intracelular de la CD28 și un al doilea domeniu de semnalizare intracelular de la CD40. În anumite aranjamente, receptorul costimulator este capabil de dimerizare. Fără a fi legați de teorie, se crede că CoStAR-ii se dimerizează sau se asociază cu alte molecule accesorii pentru inițierea semnalului. În anumite aranjamente, CoStARs se dimerizează sau se asociază cu molecule accesorii prin interacțiuni de domeniu transmembranar. În anumite aranjamente, dimerizarea sau asocierea cu molecule accesorii este asistată de interacțiuni de receptor costimulator din porțiunea intracelulară, și/sau din porțiunea extracelulară a receptorului costimulator.

DOMENIUL TRANSMEMBRANAR

Deși funcția principală a transmembranei este de a ancora CoStAR în membrana celulelor T, în anumite aranjamente, domeniul transmembranar influențează funcția CoStAR. În anumite aranjamente, domeniul transmembranar este cuprins de către domeniul de receptor costimulator primar. În aranjamentele dezvăluite aici în care constructul CoStAR cuprinde un domeniu extracelular al unui receptor și un domeniu de semnalizare intracelular al unui al doilea receptor, domeniul transmembranar poate fi cel al domeniului extracelular sau al domeniului intracelular. În anumite aranjamente, domeniul transmembranar este de la CD4, CD8 α , CD28, sau ICOS. Gueden et al. a asociat utilizarea domeniului transmembranar cu persistența crescută a CAR al celulelor T și cu eficacitatea anti-tumorală totală (Guedan S. et al., *Enhancing CAR T cell persistence through ICOS și 4-1BB costimulation*. JCI Insight. 2018;3:96976). Într-un aranjament, domeniul transmembranar cuprinde un alfa helix hidrofob care are anvergura membranei celulare.

Exemple de domenii de semnalizare CoStAR sunt furnizate în SEQ ID NO. 3-12.

Variante

În unele aranjamente, variante ale secvenței aminoacizilor fragmentelor anticorpului furnizat aici sunt avute în vedere. De exemplu, poate fi de dorit să se îmbunătățească afinitatea de legare și/sau alte proprietăți biologice ale fragmentului de anticorp. Variantele secvenței de aminoacizi ale unui fragment de anticorp pot fi preparate prin introducerea de modificări adecvate în secvența de nucleotide care codifică fragmentul de anticorp, sau prin sinteză de peptide. Asemenea modificări includ, de exemplu, deleții de la, și/sau inserții în, și/sau substituții de, resturi din secvențele de aminoacizi ale fragmentului de anticorp. Orice combinație de deleție, inserție și substituție poate fi făcută pentru a ajunge la constructul final, cu condiția ca constructul final să posede caracteristicile dorite, de ex., legare la antigen.

În unele aranjamente, fragmente ale domeniului de legare a anticorpului cuprinzând substituții, deleții sau inserții ale unuia sau mai multor aminoacizi, sunt furnizate. Situsurile de interes pentru schimbările mutaționale includ regiunile variabile ale lanțurilor greu și ușor (VR-uri) de legare ale anticorpului și cadrele (FR-uri). Substituții de aminoacid pot fi introduse într-un domeniu de legare de interes, și produșii depistați pentru activitatea dorită, de ex., legare păstrată/redușă a antigenului sau imunogenitate scăzută. În anumite aranjamente, substituții de aminoacizi pot fi introduse în unul sau mai

multe dintre domeniile de receptor costimulator primar (extracelular sau intracelular), ale domeniului de receptor costimulator secundar, sau ale domeniului co-receptor extracelular. În consecință, se dezvăluie aici proteine CoStAR și părți componente dezvăluite aici în special, precum și variante ale acestora, adică proteine CoStAR și părți componente având cel puțin 75%, cel puțin 80%, cel puțin 85%, cel puțin 87%, cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98%, cel puțin 99% identitate a secvenței cu secvențele de aminoacizi dezvăluite în special aici. Termenii „similaritate procentuală”, „identitate procentuală”, și „omologie procentuală”, când se referă la o secvență particulară, sunt utilizați așa cum sunt dați în programul de software GCG de la Universitatea din Wisconsin, BestFit. Și alți algoritmi pot fi utilizați, de ex. BLAST, psiBLAST sau TBLASTN (care utilizează metoda lui Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410), FASTA (care utilizează metoda lui Pearson and Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448),

Varianțe de secvență de aminoacizi particulare pot diferi de o secvență de referință prin inserția, adiția, substituția sau deleția unui aminoacid, a 2, 3, 4, 5-10, 10-20 sau 20-30 aminoacizi. În unele aranjamente, o secvență variantă poate cuprinde secvența de referință cu 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 sau mai multe resturi inserate, deletate sau substituite. De exemplu, 5, 10, 15, până la 20, până la 30 sau până la 40 de resturi pot fi inserate, deletate sau substituite.

În unele aranjamente preferate, o variantă poate diferi de o secvență de referință cu 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 sau mai multe substituții conservative. Substituțiile conservative implică înlocuirea unui aminoacid cu un aminoacid diferit, având proprietăți similare. De exemplu, un rest alifatic poate fi înlocuit cu un alt rest alifatic, un rest nepolar poate fi înlocuit cu un alt rest nepolar, un rest acid poate fi înlocuit cu un alt rest acid, un rest bazic poate fi înlocuit cu un alt rest bazic, un rest polar poate fi înlocuit cu un alt rest polar, sau un rest aromatic poate fi înlocuit cu un alt rest aromatic. Substituțiile conservative pot fi de exemplu între aminoacizii din următoarele grupe:

Substituțiile conservative sunt prezentate în tabelul de mai jos.

Rest original	Substituții exemplare	Substituții preferate
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	glu
Cys (C)	Ser; Ala	ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gin; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucinne; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucină	Leu

Aminoacizii pot fi grupați în clase, în conformitate cu proprietățile obișnuite ale lanțului lateral: a. hidrofobi: norleucină, Met, Ala, Val, Leu, Ile; b. hidrofili neutri: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; c. acizi: Asp, Glu; d. bazici: His, Lys, Arg; e. resturile care influențează orientarea lanțului: Gly, Pro; aromatici: Trp, Tyr, Phe. Substituțiile neconservative vor implica schimbarea unui membru al acestor clase cu o altă clasă.

CELULELE

Celulele utilizate în invenția de față pot fi orice limfocită care este utilă în terapia celulară adoptivă, cum ar fi o celulă T sau o celulă natural killer (NK), o celulă NKT, o celulă T gama/delta sau o celulă T reglatoare. Celulele pot fi alogene sau autologe pentru pacient.

5 Celulele T sau limfocitele T sunt un tip de limfocite care au un rol central în imunitatea mediată de celule. Acestea pot fi distinse de alte limfocite, cum ar fi celulele B, și celulele natural killer (celule NK), prin prezența unui receptor al celulei T (TCR) pe suprafața celulei. Există diferite tipuri de celule T, așa cum a fost rezumat mai jos. Celulele T citotoxice (celule TC, sau CTL-uri), distrug celulele infectate viral și celulele tumorale, și sunt de asemenea implicate în rejecția de transplant. CTL-urile exprimă molecula

10 CD8 pe suprafața acestora. Aceste celule își recunosc țintele prin legarea la antigenul asociat cu MHC clasa I, care este prezent pe suprafața tuturor celulelor nucleate. Prin IL-10, adenzina și alte molecule secretate de celulele T reglatoare, celulele CD8+ pot fi inactivate la o stare anergică, care previne bolile autoimune, cum ar fi encefalomielita autoimună experimentală.

15 Celulele T de memorie sunt un subset de celule T specifice pentru antigen, care persistă pe termen îndelungat după ce o infecție a fost rezolvată. Acestea se expansionează rapid la un număr mare de celule T efectoare după re-expunerea la antigenul înrudit al acestora, furnizând astfel sistemului imun „memorie” față de infecțiile trecute. Celulele T de memorie cuprind trei subtipuri: celule T de memorie centrale (celule TCM), și două tipuri de celule T de memorie efectoare (celule TEM și celule TEMRO). Celulele de

20 memorie pot fi fie CD4+ fie CD8+. Celulele T de memorie exprimă în mod obișnuit proteina de suprafață celulară CD45RO. Celulele T reglatoare (celule Treg), cunoscute anterior sub denumirea de celule T supresoare, sunt cruciale pentru întreținerea toleranței imunologice. Rolul major al acestora este de a închide imunitatea mediată de celulele T către finalul unei reacții imune și de a suprima celulele T auto-reactive care au scăpat procesului de selecție negativă în timus.

25 Două clase majore de celule Treg CD4+ au fost descrise – celule Treg naturale, și celule Treg adaptive. Celulele Treg naturale (cunoscute de asemenea sunt denumirea de celule Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) iau naștere în timus, și au fost legate de interacțiuni dintre celulele T în dezvoltare cu celule dendritice mioide (CD11c⁺) și plasmacitoide (CD123⁺) care au fost activate cu TSLP. Celulele Treg naturale pot fi distinse de alte celule T prin prezența unei molecule intracelulare denumite FoxP3.

30 Celulele Treg adaptive (cunoscute de asemenea sub denumirea de celule Tr1 sau celule Th3) pot rezulta în timpul unui răspuns imun normal.

Celulele natural killer (sau celule NK) sunt un tip de celule citolitice care formează o parte a sistemului imun înăscut. Celulele NK furnizează răspuns rapid la semnalele înăscute de la celulele infectate viral în manieră independentă de MHC. Celulele NK (care aparțin grupului de celule limfoide

35 înăscute), sunt definite ca limfocite granulare mari (LGL), și constituie al treilea tip de celule diferențiate din progenitorul limfoid comun care generează limfocitele B și T.

În anumite aranjamente dezvăluite aici, celulele terapeutice cuprind celule autologe manipulate pentru a exprima un CoStAR. Celulele autologe care exprimă Co-StAR-i pot fi avantajoasă în evitarea bolii grefă-contra-gazdă (GVDH) datorită recunoașterii mediate de TCR a alo-antigenilor primitivului. De

40 asemenea, sistemul imun al unui primitiv de CoStAR ar putea ataca celulele infuzate cu CoStAR, provocând rejecție. În anumite aranjamente, pentru a preveni GVHD, și pentru a reduce rejecția, TcR endogen este îndepărtat din celulele CoStAR prin editare genomică.

ACIZI NUCLEICI

Un aspect al dezvăluirii de față furnizează o secvență de acizi nucleici, care codifică orice

45 polipeptide CoStAR, sau proteine descrise aici (incluzând porțiuni funcționale și variante funcționale ale acestora). După cum se utilizează aici, termenii "polinucleotide", "nucleotide", și "acid nucleic" se intenționează să fie sinonimi unul cu altul. Va fi înțeles de un specialist din domeniu că numeroase polinucleotide și acizi nucleici diferiți pot codifica aceeași polipeptidă ca rezultat al degenerării codului genetic. În plus, trebuie înțeles că persoanele calificate pot, utilizând tehnici de rutină, să facă substituții de

50 nucleotide care să nu afecteze secvența de polipeptide codificată de polinucleotidele descrise aici, pentru a reflecta utilizarea codonului oricărui organism gazdă particular în care polipeptidele trebuie exprimate, de ex., optimizarea codonilor. În conformitate cu invenția, pot cuprinde ADN sau ARN. Aceștia pot fi monocatenari sau dublu-catenari. Aceștia pot fi de asemenea polinucleotide care includ în ele nucleotide modificate sau sintetice. Mai multe tipuri de modificări la oligonucleotide se cunosc în domeniu. Acestea

55 includ scheletele de metil fosfonat, și de fosforotioat. Pentru scopurile dezvăluirii de față, trebuie înțeles că polinucleotidele pot fi modificate prin orice metodă disponibilă în domeniu. Asemenea modificări pot fi efectuate pentru a intensifica activitatea in vivo sau durata de viață a polinucleotidelor de interes.

Termenii "variantă", "omolog" sau "derivat", în raport cu o secvență de nucleotide, includ orice substituție a, variație a, modificare a, înlocuire a, deleție a, sau aditie a, unui (sau mai multor acizi nucleici) acid nucleic de la secvență sau la secvență.

Secvența de acid nucleic poate codifica secvența de proteine arătată ca SEQ ID NO:2 sau o variantă a acesteia. Secvența de nucleotide poate cuprinde codonul optimizat din secvența de acizi nucleici a CD28 umană prezentată în SEQ ID NO: 1 sau variante ale acesteia (reprezentată în Fig. 1).

Dezvăluirea de față furnizează de asemenea o secvență de acizi nucleici care cuprinde o secvență de acizi nucleici care codifică un CoSTAR și o secvență de acizi nucleici suplimentară care codifică un receptor al celulei T (TCR) și/sau un receptor al unui antigen himeric (CAR).

Secvențele de acizi nucleici pot fi unite de o secvență care permite co-exprimarea celor două sau mai multe secvențe de acizi nucleici. De exemplu, constructul poate cuprinde un promotor intern, o secvență internă de intrare într-un ribozom (IRES) sau o secvență care codifică un situs de clivaj. Situsul de clivaj poate fi cu auto-clivare, cum ar fi atunci când polipeptida este produsă, este imediat clivată în proteine discrete fără necesitatea nici unei activități externe de clivare. Diferite situsuri de auto-clivare sunt cunoscute, incluzând virusul bolii piciorului și gurii (FMDV) și peptida auto-clivantă. Secvența de co-exprimare poate fi o secvență internă de intrare în ribozom (IRES). Secvența de co-exprimare poate fi un promotor intern.

VECTORI

Dezvăluirea de față furnizează un vector care cuprinde o secvență de acizi nucleici sau un construct de acizi nucleici din dezvăluirea de față.

Un asemenea vector poate fi utilizat pentru a introduce secvența sau secvențele de acizi nucleici sau constructul/construcții de acizi nucleici într-o celulă gazdă, astfel încât aceasta să exprime unul sau mai mulți CoSTAR în conformitate cu primul aspect al invenției, și, opțional, una sau mai multe alte proteine de interes (POI), de exemplu TCR sau CAR. De exemplu, vectorul poate fi o plasmidă sau un vector viral, cum ar fi un vector retroviral sau un vector lentiviral, sau un vector pe bază de transpozon sau un mRNA sintetic.

Acizii nucleici ai dezvăluirii de față pot fi utilizați de asemenea pentru imunizarea cu acizi nucleici și terapia genică, utilizând protocoale de livrare a genelor standard. Metodele de livrare a genelor sunt cunoscute în domeniu. Vezi, de ex., U.S. Pat. Nos. 5,399,346, 5,580,859, 5,589,466.

Vectorii care derivă din retrovirusuri, cum ar fi lentivirus, sunt instrumente adecvate pentru a obține transferul de gene pe termen lung, deoarece aceștia permit integrarea pe termen lung, stabilă, a unei transgene sau transgene și propagarea acestora în celulele țintă. Vectorul poate fi capabil de a transfecta sau de a transduce o limfocită incluzând o celulă T sau o celulă NK. Invenția de față furnizează de asemenea vectori în care un acid nucleic din invenția de față este inserat. Exprimarea acizilor nucleici naturali sau sintetici care codifică un CoSTAR, și opțional un TCR sau un CAR, este în mod obișnuit realizată prin legarea operabilă a unui acid nucleic care codifică polipeptidele CoSTAR și TCR/CAR sau porțiuni ale acestora la unul sau mai mulți promotori, și încorporarea constructului într-un vector de exprimare.

Elemente de promotor adiționale, de ex., amplificatori, reglează frecvența inițierii transcripționale. În mod obișnuit, aceștia sunt localizați în regiunea de la 30-110 bp din amonte situsului de start, deși s-a arătat recent că mai mulți promotori conțin elemente funcționale în aval față de situsul de start, de asemenea. Spațierea dintre elementele de promotor este frecvent flexibilă, astfel încât funcția promotorului este păstrată atunci când elementele sunt inversate sau mișcate unul în raport cu celălalt. În promotorul timidin kinazei (tk), spațierea dintre elementele promotorului poate fi crescută la 50 bp înainte ca activitatea să înceapă să scadă.

Un exemplu de promotor adecvat este secvența promotorului citomegalovirus precoce imediat (CMV). Această secvență de promotor este o secvență de promotor constitutivă puternică, capabilă de a dirija nivele ridicate ale exprimării oricărei secvențe de nucleotide legate operabil la aceasta. Un alt exemplu de promotor adecvat este factorul 1 alfa de creștere prin elongație (EF-1 α). Cu toate acestea, alte secvențe de promotor constitutive pot fi de asemenea utilizate, incluzând, dar nelimitându-se la, promotorul precoce de virus simian 40 (SV40), virusul tumorii mamare a șoarecelui (MMTV), promotorul terminal lung al virusului imunodeficienței umane (HIV) (LTR), promotorul MoMuLV, un promotor al unui virus al leucemiei aviare, un promotor precoce imediat al virusului Epstein-Barr, un promotor al virusului sarcomului Rous, precum și promotori ai unor gene umane, cum ar fi, dar nelimitându-se la, promotorul actinei, promotorul miozinei, promotorul hemoglobinei, și promotorul creatin-kinazei.

Vectorii pot fi adecvați pentru replicarea și integrarea în celulele eucariote. Vectorii de clonare obișnuite conțin terminatori ai transcripției și translației, secvențe de inițiere, și promotori utili pentru reglarea exprimării secvenței de acizi nucleici dorite. Tehnologia vectorilor virali este bine cunoscută în domeniu, și este descrisă, de exemplu, în Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), și în alte manuale de virologie și biologie moleculară, vezi de

asemenea WO 01/96584; WO 01/29058; și U.S. Pat. No.6,326,193). În unele aranjamente, construcții sunt așa cum au fost arătați în SEQ ID NOS:3-12 (reprezențați sub formă de diagramă în Fig. 2). În anumite aranjamente, acizii nucleici sunt construcții multi-cistronice care permit exprimarea a multiple transgene (de ex., CoStAR și TCR și/sau CAR etc.) sub controlul unui singur promotor. În unele aranjamente, transgenele (de ex., CoStAR și TCR și/sau CAR etc.) sunt separate de o peptidă 2A cu auto-clivare. Exemple de peptide 2A utile în construcții de acizi nucleici dezvăluți aici includ F2A, P2A, T2A și E2A. În alte aranjamente, constructul de acizi nucleici este un construct multi-cistronic, cuprinzând doi promotori; un promotor care conduce exprimarea CoStAR, și celălalt promotor care conduce exprimarea TCR sau pe a CAR. În unele aranjamente, construcții de promotori duali sunt unidirecționali. În alte aranjamente, construcții de promotori duali sunt bi-direcționali. Pentru a evalua exprimarea polipeptidei CoStAR, sau a unor porțiuni ale acesteia, vectorul de exprimare de introdus într-o celulă poate conține de asemenea fie o genă marker selectabilă, fie o genă raportoare sau ambele, pentru a facilita identificarea și selecția celulelor de exprimare din populația de celule care se caută să fie transfectată sau transdusă prin vectorii virali.

SURSE DE CELULE

Înainte de expansiunea și modificarea genetică, o sursă de celule (de ex., celule efectoare imune, de ex., celule T sau celule NK), este obținută de la un subiect. Termenul „subiect” este destinat a include organisme vii în care poate fi provocat un răspuns imun (de ex., mamifere). Exemple de subiecți includ oameni. Se includ de asemenea câini, pisici, șoareci, șobolani și specii transgenice ale acestora. Celulele T pot fi obținute din mai multe surse, incluzând celule mononucleare din sângele periferic, măduvă a osului, țesut al nodulilor limfatici, sânge din cordonul ombilical, țesut de timus, țesut de la un loc de infecție, lichide de ascită, efuziuni pleurale, țesut de splină și tumori.

Într-un aranjament, celulele T sunt izolate din limfocitele din sângele periferic prin utilizarea celulelor roșii ale sângelui și depletând monocitele, de exemplu prin centrifugarea într-un gradient PERCOLL™ sau prin elutriere centrifugală în contra-flux.

O sub-populație specifică de celule T, cum ar fi celulele CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+, și CD45RO+, poate fi izolată mai departe prin tehnici de selecție pozitivă sau negativă. De exemplu, într-un aranjament, celulele T sunt izolate prin incubare cu perle conjugate cu anti-CD3/anti-CD28, cum ar fi DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, pentru o perioadă de timp suficientă pentru selecția pozitivă a celulelor T dorite. Într-un aranjament, perioada de timp este de aproximativ 30 de minute. Într-un aranjament suplimentar, perioada de timp se situează în intervalul de la 30 de minute la 36 de ore sau mai mult și toate valorile întregi dintre acestea. Într-un aranjament suplimentar, perioada de timp este de cel puțin 1, 2, 3, 4, 5, sau 6 ore. Într-un alt aranjament preferat, perioada de timp este de la 10 la 24 de ore. Într-un aranjament, timpul perioadei de incubare este de 24 de ore. Timpuri de incubare mai îndelungate pot fi utilizați pentru a izola celulele T în orice situație unde există puține celule T comparativ cu alte tipuri de celule, cum ar fi în izolarea limfocitelor care se infiltrează în tumoare (TIL) din țesutul tumoral sau de la indivizii imunocompromiși. În plus, utilizarea de timpuri de incubare mai îndelungate poate crește eficacitatea capturării celulelor T CD8+. Astfel, doar prin scurtarea sau lungirea timpului în care celulelor T li se permite să se lege de perlele CD3/CD28 și/sau prin creșterea sau scăderea raportului dintre perle și celulele T (așa cum a fost descris mai departe aici), subpopulații de celule T pot fi selectate preferențial pentru sau împotriva la începerea culturii sau la alte momente de timp în timpul procesului. În plus, prin creșterea sau scăderea raportului de anticorpi anti-CD3 și/sau anti-CD28 de pe perle sau de pe alte suprafețe, subpopulațiile de celule T pot fi selectate preferențial pentru sau împotriva la începerea culturii sau la alte momente de timp dorite. Artizanul calificat va recunoaște că runde multiple de selecție pot fi de asemenea utilizate în contextul acestei dezvăluiri. În anumite aranjamente, poate fi de dorit să se execute procedura de selecție și utilizarea de celule „neselectate” în procesul de activare și expansiune. Celulele „neselectate” pot fi supuse de asemenea unor runde suplimentare de selecție.

Îmbogățirea unei populații de celule T prin selecție negativă poate fi realizată cu o combinație de anticorpi dirijați către markerii de suprafață unici față de celulele selectate negativ. O metodă este sortarea și/sau selecția celulelor prin imunoaderență magnetică negativă sau citometrie în flux, care utilizează un cocktail de anticorpi monoclonali dirijați către markerii de suprafață celulară prezenți pe celulele selectate negativ. De exemplu, îmbogățirea în celule CD4+ prin selecție negativă, un cocktail de anticorpi monoclonali include în mod obișnuit anticorpi față de CD14, CD20, CD16, HLA-DR, și CD8. În anumite aranjamente, poate fi de dorit să se îmbogățească sau să se selecteze pozitiv celule T reglatoare care exprimă în mod obișnuit CD4+, CD25+, CD62Lhi, GITR+, CD137, PD1, TIM3, LAG-3, CD150 și FoxP3+. Ca alternativă, în anumite aranjamente, celulele T reglatoare sunt depletate prin perle conjugate cu anti-CD25 sau prin altă metodă similară de selecție.

Metodele descrise aici pot include, de ex., selecția unei subpopulații specifice de celule efectoare imune, de ex. celule T, care sunt o populație depletată de celule T, care sunt o populație de celule T reglatoare, celule depletate de CD25+, utilizând, de ex., o tehnică de selecție negativă, de ex., descrisă aici.

De preferință, populația de celule depletate T reglatoare conține mai puțin de 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% de celule CD25+.

O subpopulație specifică de celule efectoare CoStAR care se leagă specific la un antigen țintă poate fi îmbogățită prin tehnici de selecție pozitive. De exemplu, în unele aranjamente, celulele efectoare sunt îmbogățite prin incubare cu perle conjugate cu antigen țintă pentru o perioadă de timp suficientă pentru selecția pozitivă a celulelor abTCR dorite. În unele aranjamente, perioada de timp este aproximativ 30 de minute. În unele aranjamente, perioada de timp se situează în intervalul de la 30 de minute la 36 de ore sau mai mult (incluzând toate intervalele dintre aceste valori). În unele aranjamente, perioada de timp este cel puțin una, 2, 3, 4, 5, sau 6 ore. În unele aranjamente, perioada de timp este de la 10 la 24 de ore. În unele aranjamente, perioada de timp de incubare este de 24 de ore. Pentru izolarea celulelor efectoare prezente la nivele scăzute în populația de celule heterologe, utilizarea de timpi de incubare mai îndelungați, cum ar fi 24 de ore, poate crește randamentul celular. Timpi de incubare mai îndelungați pot fi utilizați pentru a izola celule efectoare în orice situație în care există puține celule efectoare, comparativ cu alte tipuri de celule. Specialistul va recunoaște că multiple runde de selecție pot fi de asemenea utilizate în contextul acestei dezvoltări.

Celulele T pentru stimulare pot fi de asemenea înghețate după o etapă de spălare. După etapa de spălare care îndepărtează plasma și plachetele, celulele pot fi suspendate într-o soluție de înghețare. În timp ce mulți parametri de înghețare și soluții de înghețare sunt cunoscute în domeniu și vor fi utili în acest context, o metodă implică utilizarea de PBS care conține 20% DMSA și 8% albumină serică umană, sau mediu de cultură conținând 10% dextran 40 și 5% dextroză, 20% albumină serică umană și 7,5% DMSO, sau 31,25% Plasmalyte-A, 31,25% dextroză 5%, 0,45% NaCl, 10% dextran 40 și 5% dextroză, 20% albumină serică umană, și 7,5% DMSO sau alte medii de înghețare a celulelor conținând de exemplu, Hespan și PlasmaLyte A, celulele sunt apoi înghețate la -80°C cu o viteză de 1° per minut și depozitate în faza de vapori a unui rezervor de depozitare a azotului lichid. Alte metode de înghețare controlată pot fi utilizate, precum și înghețarea necontrolată imediat la -20° C sau în azot lichid.

CoStAR alogenici

În aranjamentele descrise aici, celulele efectoare imune pot fi celule efectoare imune alogene, de ex., celule T sau celule NK. De exemplu, celula poate fi o celulă T alogenă, de ex. o celulă T alogenă care nu prezintă exprimarea receptorilor celulelor T endogen (TCR) și sau antigenul leucocitelor umane (HLA), de ex., HLA clasa I și/sau HLA clasa II.

O celulă T care nu are TCR funcționali endogeni poate fi, de ex., manipulată astfel încât să nu exprime nici un TCR funcțional la suprafața acesteia, manipulată astfel încât să nu exprime una sau mai multe subunități care cuprind un TCR funcțional (de ex., manipulat astfel încât să nu exprime (sau să prezinte o exprimare redusă) a TCR alfa, TCR beta, TCR gama, TCR delta, TCR epsilon, și/sau TCR zeta) sau manipulate astfel încât să producă TCR funcționali foarte puțini pe suprafața acesteia. Ca alternativă, celulele T pot exprima niște TCR substanțial deteriorați, de ex. prin exprimarea unor forme mutate sau trunchiate a uneia sau mai multor subunități ale TCR. Termenul "TCR substanțial deteriorat" înseamnă că acest TCR nu va provoca o reacție adversă imună într-o gazdă.

O celulă T descrisă aici poate fi manipulată de ex., astfel încât să nu exprime un HLA funcțional pe suprafața acesteia. De exemplu, o celulă T descrisă aici poate fi manipulată astfel încât HLA de exprimare la suprafața celulei, de ex., HLA clasa I și/sau HLA clasa II, sunt reglați în jos. În unele aranjamente, reglarea în jos a HLA poate fi realizată prin reducerea sau eliminarea exprimării beta-2 microglobulinei (B2M).

În anumite aranjamente dezvoltate aici, celula T poate să nu aibă un TCR funcțional și un HLA funcțional, de ex., HLA clasa I și/sau HLA clasa II. Celulele T modificate care nu prezintă exprimarea unui TCR funcțional și/sau HLA pot fi obținute prin orice mijloace adecvate, incluzând un knock out sau un knock down al uneia sau mai multor subunități ale TCR sau HLA. De exemplu, celulele T pot include un knock down al TCR și/sau HLA utilizând siARN, shARN, repetări palindromice scurte interspațiate (CRISPR), nucleaze efectoare asemănătoare transcripției (TALEN), sau endonucleaze degete de zinc (ZFN).

În unele aranjamente, celula alogenă poate fi o celulă care nu exprimă, sau care exprimă la nivele scăzute, o moleculă inhibitoare, de ex., o celulă manipulată prin orice metodă descrisă aici. De exemplu, celula poate fi o celulă care nu exprimă, sau care exprimă la nivele scăzute, o moleculă inhibitoare, de ex., cea care scade capacitatea unei celule care exprimă CoStAR să producă un răspuns efector imun. Exemple de molecule inhibitoare includ PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (de ex., CEACAM-1, CEACAM-3 și/sau CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 sau CD270), KIR, A2aR, MHC clasa I, MHC clasa II, Gal9, adenzină, și TGFR beta. Inhibiția unei molecule inhibitoare, de ex., prin inhibiția ADN, ARN sau nivelului de proteină, poate optimiza performanța celulei care exprimă CAR. În aranjamente, un acid

nucleic inhibitor, de ex., un acid nucleic inhibitor cum ar fi de ex. un dsARN, de ex., un siRNA sau un shRNA, repetări palindromice scurte interspațiate regulat aglomerate (CRISPR), o nuclează efectoră asemănătoare activatorului transcripției (TALEN) sau o endonuclează deget de zinc (ZFN), de ex., așa cum au fost descrise aici, pot fi utilizate.

5 **siARN și shARN pentru a inhiba TCR endogen sau HLA**

În unele aranjamente, exprimarea TCD și/sau a HLA poate fi inhibată utilizând siARN sau shARN care țintesc un acid nucleic care codifică TCR și/sau HLA, și/sau o moleculă inhibitoră descrisă aici (de ex., PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (de ex., CEACAM-1, CEACAM-3 și/sau CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 sau CD270), KIR, A2aR, MHC clasa I, MHC clasa II, Gal9, adozină, și TGFR beta), într-o celulă T.

Exprimarea siARN și shARN în celulele T poate fi realizată utilizând orice sistem de exprimare convențional, de ex., cum ar fi un sistem de exprimare lentiviral. shARN exemplari care reglează în jos exprimarea componentelor TCR sunt descrise de ex., în US Publication No.: 2012/0321667. siARN și shARN exemplari care reglează în jos exprimarea genelor HLA clasa I și/sau HLA clasa II sunt descriși, de ex., în publicația SUA nr.: US 2007/0036773.

15 **CRISPR pentru inhibarea TCR sau a HLA**

"CRISPR" sau "CRISPR pentru a inhiba TCR și/sau HLA" după cum se utilizează aici se referă la un set de repetări palindromice scurte interspațiate, sau la un sistem cuprinzând un set de repetări. "Cas", după cum se utilizează aici, se referă la o proteină asociată cu CRISPR. Un sistem "CRISPR/Cas" se referă la un sistem derivat de la CRISPR și Cas, care poate fi utilizat pentru a silenția sau a muta o genă a TCR sau a HLA, și/sau o moleculă inhibitoră descrise aici (de ex., PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (de ex., CEACAM-1, CEACAM-3 și/sau CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 sau CD270), KIR, A2aR, MHC clasa I, MHC clasa II, GAL9, adozină, și TGFR beta).

Sistemele CRISPR/Cas naturale se găsesc în aproximativ 40% din genomurile de eubacterii secvențiate ale archaea secvențiate. Grissa et al. (2007) BMC Bioinformatics 8: 172. Acest sistem este un tip de sistem imun procariotic care conferă rezistență la elemente genetice străine, cum ar fi plasmide și fagi, și furnizează o formă de imunitate dobândită. Barrangou et al. (2007) Science 315: 1709-1712; Marragini et al. (2008) Science 322: 1843-1845.

25 **Activarea și expansiunea celulelor T**

Celulele T pot fi activate și expansionate utilizând în general metode așa cum au fost descrisă de exemplu în brevetele SUA

6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; și în cererea de brevet SUA nr. 20060121005.

În general, celulele T din invenție pot fi expansionate prin contactul cu o suprafață care are atașat un agent care stimulează un semnal asociat cu complexul CD3/TCR și un ligand care stimulează o moleculă costimulatorie pe suprafața celulelor T. În special, populațiile de celule T pot fi stimulate așa cum a fost descris aici, cum ar fi prin contactul cu un anticorp anti-CD3, sau cu un fragment de legare a antigenului al acestuia, sau cu un anticorp anti-CD2 imobilizat pe o suprafață, sau prin contactul cu un activator al protein kinazei C (de ex., briostatina) împreună cu un ionofor de calciu. Pentru co-stimularea unei molecule accesorii de pe suprafața celulelor T, un ligand care leagă molecula accesorie este utilizat. De exemplu, o populație de celule T poate fi pusă în contact cu un anticorp anti-CD3, și cu un anticorp anti-CD28, în condiții adecvate pentru stimularea proliferării celulelor T. Pentru a stimula proliferarea celulelor T CD4+ sau a celulelor T CD8+, un anticorp anti-CD3 și un anticorp anti-CD28 pot fi utilizați. Exemple de anticorp anti-CD28 includ 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diacione, Besancon, France) care pot fi utilizați ca alte metode cunoscute în mod obișnuit în domeniu (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9): 13191328, 1999; Garlși et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

În unele aranjamente, expansiunea poate fi realizată utilizând flacoane sau recipiente, sau recipiente permeabile pentru gaz de specialiști din domeniu, și poate să aibă loc timp de 7 zile, 8 zile, 9 zile, 10 zile, 11 zile, 12 zile, 13 zile, sau 14 zile, de la aproximativ 7 zile la aproximativ 14 zile, aproximativ 8 zile la aproximativ 14 zile, aproximativ 9 zile la aproximativ 14 zile, aproximativ 10 zile la aproximativ 14 zile, aproximativ 11 zile la aproximativ 14 zile, aproximativ 12 zile la aproximativ 14 zile, sau aproximativ 13 zile la aproximativ 14 zile. În unele aranjamente, a doua expansiune a TIL poate avea loc timp de aproximativ 14 zile.

În anumite aranjamente, expansiunea poate fi executată utilizând stimularea receptorului celulei T, în prezența interleukinei - 2 (IL-2) sau a interleukinei -15 (IL-15). Stimulul receptorului celulelor T nespecifice poate include, de exemplu, un anticorp anti-CD3, cum ar fi aproximativ 30 ng/ml de OKT3, un

anticorp anti-CD3 monoclonal de șoarece (disponibil în comerț de la Ortho-McNeil, Raritan, N.J. sau de la Miltenyi Biotec, Auburn, Calif.) sau UHCT-1 (disponibil în comerț de la BioLegend, San Diego, Calif., USA). Celulele CoStAR pot fi expandate in vitro incluzând unul sau mai mulți antigeni, incluzând porțiuni antigenice ale acestora, cum ar fi unul sau mai mulți epitopi ai unui cancer, care pot fi opțional exprimați dintr-un vector, cum ar fi o peptidă de legare a antigenului leucocitar uman A2 (HLA-A2), de ex., 0,3 .mu.M MART-1:26-35 (27 L) sau gpl 00:209-217 (210M), opțional în prezența unui factor de creștere a celulelor T, cum ar fi 300 IU/mL IL-2 sau IL-15. Alți antigeni adecvați pot include, de ex., NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, antigenul de cancer tirozinază, MAGE-A3, SSX-2, și VEGFR2, sau porțiuni antigenice ale acestora. Celulele CoStAR pot fi de asemenea expandate rapid prin restimularea cu același antigen sau cu aceiași antigeni ai cancerului pulsați pe celule care prezintă antigeni care exprimă HLA-A2. Ca alternativă, celulele CoStAR pot fi stimulate suplimentar cu, de ex., limfocite autologe iradiate sau cu limfocite alogene HLA-A2+ iradiate și cu IL-2. În unele variante de realizare, stimularea are loc ca parte a expansiunii. În unele variante de realizare, expansiunea are loc în prezența de limfocite autologe, iradiate, sau cu limfocite alogene HLA-A2+ iradiate și IL-2.

În anumite aranjamente, mediul de cultură de celule cuprinde IL-2. În unele aranjamente, mediul de cultură de celule cuprinde aproximativ 1000 IU/mL, aproximativ 1500 IU/mL, aproximativ 2000 IU/mL, aproximativ 2500 IU/mL, aproximativ 3000 IU/mL, aproximativ 3500 IU/mL, aproximativ 4000 IU/mL, aproximativ 4500 IU/mL, aproximativ 5000 IU/mL, aproximativ 5500 IU/mL, aproximativ 6000 IU/mL, aproximativ 6500 IU/mL, aproximativ 7000 IU/mL, aproximativ 7500 IU/mL, sau aproximativ 8000 IU/mL, sau între 1000 și 2000 IU/mL, între 2000 și 3000 IU/mL, între 3000 și 4000 IU/mL, între 4000 și 5000 IU/mL, între 5000 și 6000 IU/mL, între 6000 și 7000 IU/mL, între 7000 și 8000 IU/mL, sau între 8000 IU/mL de IL-2.

În anumite aranjamente, mediul de cultură de celule cuprinde anticorpi OKT3. În unele aranjamente, mediul de cultură de celule cuprinde aproximativ 0,1 ng/mL, aproximativ 0,5 ng/mL, aproximativ 1 ng/mL, aproximativ 2,5 ng/mL, aproximativ 5 ng/mL, aproximativ 7,5 ng/mL, aproximativ 10 ng/mL, aproximativ 15 ng/mL, aproximativ 20 ng/mL, aproximativ 25 ng/mL, aproximativ 30 ng/mL, aproximativ 35 ng/mL, aproximativ 40 ng/mL, aproximativ 50 ng/mL, aproximativ 60 ng/mL, aproximativ 70 ng/mL, aproximativ 80 ng/mL, aproximativ 90 ng/mL, aproximativ 100 ng/mL, aproximativ 200 ng/mL, aproximativ 500 ng/mL, aproximativ 1 µg/mL sau între 0,1 ng/mL și 1 ng/mL, între 1 ng/mL și 5 ng/mL, între 5 ng/mL și 10 ng/mL, între 10 ng/mL și 20 ng/mL, între 20 ng/mL și 30 ng/mL, între 30 ng/mL și 40 ng/mL, între 40 ng/mL și 50 ng/mL, sau între 50 ng/mL și 100 ng/mL anticorpi OKT3.

În anumite aranjamente, o combinație de IL-2, IL-7, IL-15, și/sau IL-21 este utilizată ca combinație în timpul expansiunii. În unele aranjamente, IL-2, IL-7, IL-15, și/sau IL-21 precum și orice combinații ale acestora, pot fi incluse în timpul expansiunii. În unele aranjamente, o combinație de IL-2, IL-15, și IL-21 se utilizează ca combinație în timpul expansiunii. În unele aranjamente, IL-2, IL-15, și IL-21 precum și orice combinații ale acestora, pot fi incluse.

În anumite aranjamente, expansiunea poate fi realizată într-un mediu de cultură de celule suplimentar cuprinzând IL-2, OKT-3, și celule alimentator care prezintă antigen.

În anumite aranjamente, mediu de cultură de expansiune cuprinde aproximativ 500 IU/mL de IL-15, aproximativ 400 IU/ml de IL-15, aproximativ 300 IU/ml de IL-15, aproximativ 200 IU/ml de IL-15, aproximativ 180 IU/ml de IL-15, aproximativ 160 IU/ml de IL-15, aproximativ 140 IU/ml de IL-15, aproximativ 120 IU/ml de IL-15, sau aproximativ 100 IU/ml de IL-15, sau de la aproximativ 500 IU/ml de IL-15 la aproximativ 100 IU/ml de IL-15, sau de la aproximativ 400 IU/ml de IL-15 la aproximativ 100 IU/ml de IL-15 sau de la aproximativ 300 IU/ml de IL-15 la aproximativ 100 IU/ml de IL-15 sau de la aproximativ 200 IU/ml de IL-15, sau aproximativ 180 IU/ml de IL-15.

În unele aranjamente, mediul de cultură de expansiune cuprinde aproximativ 20 IU/ml de IL-21, aproximativ 15 IU/ml de IL-21, aproximativ 12 IU/ml de IL-21, aproximativ 10 IU/ml de IL-21, aproximativ 5 IU/ml de IL-21, aproximativ 4 IU/ml de IL-21, aproximativ 3 IU/ml de IL-21, aproximativ 2 IU/ml de IL-21, aproximativ 1 IU/ml de IL-21, sau aproximativ 0,5 IU/ml de IL-21, sau de la aproximativ 20 IU/ml de IL-21 la aproximativ 0,5 IU/ml de IL-21, sau aproximativ 15 IU/ml de IL-21 la aproximativ 0,5 IU/ml de IL-21, sau aproximativ 12 IU/ml de IL-21 la aproximativ 0,5 IU/ml de IL-21, sau aproximativ 10 IU/ml de IL-21 la aproximativ 0,5 IU/ml de IL-21, sau aproximativ 5 IU/ml de IL-21 la aproximativ 1 IU/ml de IL-21, sau aproximativ 2 IU/ml de IL-21. În unele aranjamente, mediul de cultură de celule cuprinde aproximativ 1 IU/ml de IL-21, sau aproximativ 0,5 IU/ml de IL-21.

În anumite aranjamente celulele alimentator care prezintă antigen (APC) sunt PBMC-uri. Într-un aranjament, raportul dintre celulele CoStAR și PBMC-uri și/sau celulele care prezintă antigen în expansiune este de la aproximativ 1 la 25, aproximativ 1 la 50, aproximativ 1 la 100, aproximativ 1 la 125, aproximativ 1 la 150, aproximativ 1 la 175, aproximativ 1 la 200, aproximativ 1 la 225, aproximativ 1 la 250, aproximativ 1 la 275, aproximativ 1 la 300, aproximativ 1 la 325, aproximativ 1 la 350, aproximativ 1 la

375, aproximativ 1 la 400, sau aproximativ 1 la 500, sau între 1 la 50 și 1 la 300, sau între 1 la 100 și 1 la 200.

În anumite aranjamente, semnalul stimulator primar și semnalul co-stimulator pentru celula T poate fi furnizat prin diferite protocoale. De exemplu, agenții care furnizează fiecare semnal pot fi în soluție sau cuplați cu o suprafață. Atunci când sunt cuplați cu o suprafață, agenții pot fi cuplați cu aceeași suprafață (adică, în formație „cis”), sau cu suprafețe separate (adică, în formație „trans”). Ca alternativă, un agent poate fi cuplat cu o suprafață, și celălalt agent poate fi în soluție. Într-un aranjament, agentul care furnizează semnalul costimulator este legat la o suprafață a unei celule, și agentul care furnizează semnalul de activare primar este în soluție sau cuplat cu o suprafață. În anumite aranjamente, ambii agenți pot fi în soluție. Într-un aranjament, agenții pot fi sub formă solubilă, și apoi reticulați la o suprafață, cum ar fi o celulă care exprimă receptorii Fc sau un anticorp sau un alt agent de legare, care se va lega la agenți. În această privință, vezi, de exemplu, U.S. Patent Application Publication Nos. 20040101519 și 20060034810 pentru celulele care prezintă antigeni artificiali (APC) care sunt avuți în vedere pentru utilizare în celulele care prezintă antigeni artificiale (aAPC) care sunt avute în vedere pentru utilizare în activarea și expansiunea celulelor T din dezvoltarea de față.

Într-un aranjament, cei doi agenți sunt imobilizați pe perle, fie pe aceeași perlă, adică, "cis", sau pe perle separate, adică, "trans." Ca exemplu, antigenul care furnizează semnalul de activare primar este un anticorp anti-CD3 sau un fragment de legare a antigenului al acestuia, și agentul care furnizează semnalul costimulator este un anticorp anti-CD28 sau un fragment de legare a antigenului al acestuia; și ambii agenți sunt co-imobilizați pe aceeași perlă în cantități moleculare echivalente. Într-un aranjament, un raport de 1:1 al fiecărui anticorp legat la perle pentru expansiunea celulelor T CD4+ și pentru creșterea celulelor T este utilizat. În anumite aspecte ale dezvoltării de față, un raport al anticorpilor anti CD3:CD28 legați la perle este utilizat, astfel încât o creștere a expansiunii celulelor T este observată comparativ cu expansiunea observată utilizând un raport de 1:1. Într-un aranjament particular, o creștere de la aproximativ 1 la aproximativ 3 ori este observată comparativ cu expansiunea observată utilizând un raport de 1:1. Într-un aranjament, raportul anticorpilor CD3:CD28 legați la perle se situează în intervalul de la 100:1 la 1:100 și toate valorile întregi între. Într-un aranjament al dezvoltării de față, mai mult anticorp anti-CD28 este legat la particule decât anticorp anti-CD3, adică, raportul CD3:CD28 este mai puțin de unu. În anumite aranjamente ale dezvoltării, raportul dintre anticorpii anti CD28 și anticorpii anti CD3 legați la perle este mai mare de 2:1. Într-un aranjament particular, un raport de 1:100 CD3:CD28 al anticorpilor legați la perle este utilizat. Într-un aranjament, un raport de 1:75 CD3:CD28 al anticorpilor legați la perle este utilizat. Într-un aranjament suplimentar, un raport de 1:50 CD3:CD28 al anticorpilor legați la perle este utilizat. Într-un aranjament, un raport de 1:30 CD3:CD28 al anticorpilor legați la perle este utilizat. Într-un aranjament preferat, un raport de 1:10 CD3:CD28 al anticorpilor legați la perle este utilizat. Într-un aranjament, un raport de 1:3 CD3:CD28 al anticorpilor legați la perle este utilizat. Într-o altă concretizare, un raport de 3:1 CD3:CD28 dintre anticorpii legați la perle este utilizat.

Rapoartele dintre particule și celule de la 1:500 la 500:1 și orice valori întregi între pot fi utilizate pentru a stimula celulele T sau alte celule țintă. După cum va aprecia rapid un specialist din domeniu, raportul dintre particule și celule poate depinde de mărimea particulei în raport cu celula țintă. De exemplu, perlele cu mărime mică pot lega doar puține celule, în timp ce perlele mari pot lega multe. În anumite aranjamente raportul dintre celule și particule se situează în intervalul de la 1:100 la 100:1 și orice valori întregi între și în aranjamente suplimentare raportul cuprinde de la 1:9 la 9:1 și orice valori întregi între, poate fi de asemenea utilizat pentru a stimula celulele T. Raportul dintre particulele anti-CD3- și anti-CD28 cuplate cu celulele T care are ca rezultat stimularea celulelor T poate varia așa cum a fost observat mai sus, cu toate acestea, anumite valori preferate includ 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, și 15:1, cu un raport preferat fiind cel puțin 1:1 per celulă T. Într-un aranjament, un raport al particulelor la celule de 1:1 sau mai puțin este utilizat. Într-un aranjament particular, un raport preferat particulară: celulă este 1:5. În aranjamente suplimentare, raportul dintre particule și celule poate fi variat depinzând de ziua stimulării. De exemplu, într-un aranjament, raportul dintre particule și celule este de la 1:1 la 10:1 în prima zi, și particule adiționale sunt adăugate la celule în fiecare zi sau la două zile, până la 10 zile, la rapoarte finale de la 1:1 la 1:10 (pe baza numărului de celule din ziua adăugării). Într-un aranjament particular, raportul dintre particule și celule este 1:1 în prima zi de stimulare, și este ajustat la 1:5 în zilele trei și cinci de stimulare. Într-un aranjament, particulele sunt adăugate zilnic sau la două zile la raportul final de 1:1 în prima zi, și 1:5 în zilele trei și cinci de stimulare. Într-un aranjament, raportul dintre particule și celule este 2:1 în prima zi de stimulare și este ajustat la 1:10 în zilele trei și cinci de stimulare. Într-un aranjament, particulele sunt adăugate zilnic sau la două zile, la un raport final de 1:1 în prima zi, și 1:10 în zilele trei și cinci de stimulare. Un specialist din domeniu va aprecia că o varietate de alte rapoarte va fi adecvată pentru utilizare în dezvoltarea de față. În

special, rapoartele vor varia depinzând de mărimea particulei și de tipul și mărimea celulei. Într-un aranjament, cele mai obișnuite rapoarte pentru utilizare se află în vecinătatea de 1:1, 2: 1 și 3:1 în prima zi.

În aranjamente suplimentare ale dezvoltării de față, celulele, cum ar fi celulele T, sunt combinate cu perle acoperite cu agent, perlele și celulele sunt separate ulterior, și apoi celulele sunt cultivate. Într-un aranjament alternativ, înainte de cultivare, perlele acoperite cu agent și celulele nu sunt separate, ci sunt cultivate împreună. Într-un aranjament suplimentar, perlele și celulele sunt întâi concentrate prin aplicarea unei forțe, cum ar fi forța magnetică, având ca rezultat o legare crescută a markerilor de suprafață celulară, prin aceasta inducând stimularea celulei.

PREPARAREA CELULELOR CoStAR

Instrumente de manipulare genetică bazate pe virusuri și care nu sunt bazate pe virusuri pot fi utilizate pentru a genera celule T CoStAR, având ca rezultat exprimarea permanentă sau tranzitorie a genelor terapeutice. Livrarea de gene pe bază de retrovirus este o tehnologie matură, bine caracterizată, care a fost utilizată pentru a integra permanent CAR în genomul celulei gazdă (Scholler J., de ex. Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. *Sci. Transl. Med.* 2012;4:132ra53; Rosenberg S.A. et al., Gene transfer into humans-immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N. Engl. J. Med.* 1990;323:570-578).

Metode de transfecție cu ADN non viral pot fi de asemenea utilizate. De exemplu, Singh et al descriu utilizarea sistemului de transpozoni Frumoasa Adormită (SB) dezvoltat pentru a manipula celulele T CAR (Singh H., et al., Redirecting specificity of T-cell populations for CD19 using the Sleeping Beauty system. *Cancer Res.* 2008;68:2961-2971) și este utilizat în studii clinice (vezi de ex., ClinicalTrials.gov: NCT00968760 și NCT01653717). Aceeași tehnologie este aplicabilă pentru a manipula celulele CoStAR.

Multiple enzime SB au fost utilizate pentru a livra transgenele. Mátés descrie o transpozază hiperactivă (SB100X) cu o îmbunătățire de aproximativ 100 de ori a eficienței comparativ cu transpozaza de primă generație. SB100X a sprijinit un transfer de gene stabile 35-50% în celulele CD34(+) umane îmbogățite în celule stem hematopoietice sau strămoș. (Mátés L. et al., Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat. Genet.* 2009;41:753-761) și multiple transgene pot fi livrate din plasmide unice multicistronice (de ex., Thokala R. et al., Redirecting specificity of T cells using the Sleeping Beauty system to express chimeric antigen receptors by mix-and-matching of VL and VH domains targeting CD123+ tumors. *PLoS ONE.* 2016;11:e0159477) sau multiple plasmide (de ex., Hurton L.V. et al., Tethered IL-15 augments antitumor activity and promotes a stem-cell memory subset in tumor-specific T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016;113:E7788-E7797). Asemenea sisteme sunt utilizate cu CoStAR din invenție.

Morita et al, descriu sistemul de transpozoni piggyBac pentru a integra transgene mai mari (Morita D. et al., Enhanced expression of anti-CD19 chimeric antigen receptor in piggyBac transposon-engineered T cells. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2017;8:131-140) Nakazawa et al. descriu utilizarea sistemului pentru a genera celule T citotoxice specifice pentru EBV care exprimă receptorii de antigeni himerici specifici pentru HER2 (Nakazawa Y et al, PiggyBac-mediated cancer immunotherapy using EBV-specific cytotoxic T-cells expressing HER2-specific chimeric antigen receptor. *Mol. Ther.* 2011;19:2133-2143). Manuri et al au utilizat sistemul pentru a genera celule T specifice pentru CD-19 (Manuri P.V.R. et al., piggyBac transposon/transposase system to generate CD19-specific T cells for the treatment of B-lineage malignancies. *Hum. Gene Ther.* 2010;21:427-437).

Tehnologia transpozoniului este ușoară și ieftină. Un dezavantaj potențial este reprezentat de protocoalele de expansiune mai îndelungate utilizate care pot avea ca rezultat diferențierea celulelor T, activitatea deteriorată și persistența slabă a celulelor infuzate. Monjezi et al descriu dezvoltarea de vector minicirculari care minimizează aceste dificultăți prin integrare cu eficiență mai mare (Monjezi R. et al., Enhanced CAR T-cell engineering using non-viral Sleeping Beauty transposition from minicircle vectors. *Leukemia.* 2017;31:186-194). Aceste tehnologii cu transpozoni pot fi utilizate pentru CoStAR din invenție.

COMPOZIȚII FARMACEUTICE

Dezvăluirea de față se referă la de asemenea la o compoziție farmaceutică care conține un vector sau o celulă care exprimă CoStAR din dezvoltare, împreună cu un purtător, diluant sau excipient farmaceutic acceptabili, și opțional una sau mai multe polipeptide farmaceutic acceptabile și/sau unul sau mai mulți compuși farmaceutic acceptabili.

În unele aranjamente, o compoziție farmaceutică este furnizată, cuprinzând un CoStAR descris mai sus și un purtător farmaceutic acceptabil. În unele aranjamente, o compoziție farmaceutică este furnizată cuprinzând un acid nucleic care codifică un CoStAR în conformitate cu oricare dintre aranjamentele descrise mai sus, și un purtător farmaceutic acceptabil. În unele aranjamente, o compoziție farmaceutică este furnizată, cuprinzând o celulă efectorie care exprimă un CoStAR descris mai sus, și un

purtător farmaceutic acceptabil. O asemenea formulare poate fi de exemplu sub o formă adecvată pentru perfuzie intravenoasă.

După cum se utilizează aici, prin "farmaceutic acceptabil" sau "farmacologic compatibil" se înțelege un material care nu este indezirabil biologic sau în alt fel, de ex., materialul poate fi încorporat într-o compoziție farmaceutică de administrat la un pacient, fără a produce nici un efect biologic semnificativ nedorit sau fără a interacționa în manieră dăunătoare cu orice alt compus al compoziției în care este conținut. Purtătorii sau excipienții farmaceutici acceptabili au satisfăcut de preferință standardele necesare de testare toxicologică și de fabricație, și/sau sunt incluși în Ghidul Ingredientelor Inactive pregătit de Administrația SUA pentru Alimente și Medicamente.

Un aspect al invenției furnizează o populație de celule T modificate care exprimă un CoStAR recombinat. O populație adecvată poate fi produsă printr-o metodă descrisă mai sus.

Populația de celule T modificate poate fi pentru utilizare ca medicament. De exemplu, o populație de celule T modificate așa cum a fost descrisă aici poate fi utilizată în imunoterapia cancerului, de exemplu în terapia cu celule T adoptive.

Alte aranjamente furnizează utilizarea unei populații de celule T modificate așa cum a fost descrisă aici, pentru fabricarea unui medicament pentru tratamentul cancerului, a unei populații de celule T modificate așa cum a fost descrisă aici pentru tratamentul cancerului, și o metodă de tratament al cancerului (nerevendicat) poate cuprinde administrarea unei populații de celule T modificate așa cum a fost descrisă aici la un individ care are nevoie de aceasta.

Populația de celule T modificate poate fi autologă, adică celulele T modificate au fost obținute original de la același individ la care acestea sunt administrate ulterior (adică, individul donor și individul primitor este același). O populație adecvată de celule T modificate pentru administrarea la individ poate fi produsă printr-o metodă cuprinzând furnizarea unei populații inițiale de celule T obținute de la individ, modificarea celulelor T pentru a exprima un PDE cAMP sau un fragment al acestuia și un receptor de antigen care se leagă specific la celulele canceroase ale individului, și cultivarea celulelor T modificate.

Populația de celule T modificate poate fi alogenă, adică celulele T modificate au fost obținute la origine de la un individ diferit față de individul căruia îi sunt administrate ulterior (adică, individul donor și cel primitor sunt diferiți). Indivizii donor și primitor pot avea HLA potrivit pentru a evita GVHD și alte efecte imune indezirabile. O populație adecvată de celule T modificate pentru administrarea la un individ primitor poate fi produsă printr-o metodă care cuprinde furnizarea unei populații inițiale de celule T obținute de la un individ donor, modificarea celulelor T pentru a exprima un CoStAR care se leagă specific la celulele de cancer de la individul primitor, și cultivarea celulelor T modificate.

După administrarea (nerevendicată) a celulelor T modificate, individul primitor poate prezenta un răspuns imun mediat de celulele T față de celulele canceroase din individul primitor. Acest fapt poate avea un efect benefic asupra stării de cancer de la individ.

Stările de cancer pot fi caracterizate de proliferarea celulelor canceroase maligne și pot include leucemiile, cum ar fi AML, CML, ALL și CLL, limfoamele, cum ar fi limfomul Hongkin, limfomul non Hodgkin, și mielomul multiplu, și cancerurile solide, cum ar fi sarcoamele, cancerul de piele, melanomul, cancerul de vezică urinară, cancerul de creier, cancerul mamar, cancerul uterului, cancerul ovarului, cancerul prostatei, cancerul plămânului, cancerul colo-rectal, cancerul cervical, cancerul de ficat, cancerul capului și gâtului, cancerul esofagian, cancerul de pancreas, cancerul renal, cancerul glandelor suprarenale, cancerul de stomac, cancerul testicular, cancerul vezicii biliare și al tracturilor biliare, cancerul tiroidian, cancerul de timus, cancerul de os, și cancerul cerebral, precum și cancerul cu sediu primar necunoscut (CUP).

Celulele de cancer de la un individ pot fi distincte imunologic de celulele somatice normale de la individ (adică, tumoarea canceroasă poate fi imunogenă). De exemplu, celulele de cancer pot fi capabile de a provoca un răspuns imun sistemic în individ împotriva unuia sau mai multor antigeni exprimați de celulele de cancer. Antigenii tumorali care provoacă răspunsul imun pot fi specifici pentru celulele canceroase, sau pot fi împărțășiți de una sau mai multe celule normale din individ.

Un individ adecvat pentru tratamentul așa cum a fost descris mai sus, poate fi un mamifer, poate fi un rozător (de ex., cobai, hamster, șobolan, șoarece), murin (de ex., un șoarece), canin (de ex., câine), felin (de ex., pisică), echin (de ex., cal), un primat, un simian (de ex., maimuță sau o gorilă), o maimuță (de ex., marmosetă, babuin), o maimuță fără coadă (gorilă, cimpanzeu, urangutan, gibbon), sau om.

În aranjamente preferate, individul este un om. În alte aranjamente preferate, mamifere non umane, în special mamifere care sunt convențional utilizate ca modele pentru demonstrarea eficacității terapeutice la oameni (de ex., animale murine, primare, porcine, canine, sau iepuri) pot fi utilizate.

METODA DE TRATAMENT

Termenul "cantitate terapeutică eficientă" se referă la o cantitate de CoStAR sau compoziție cuprinzând un CoStAR așa cum a fost dezvoltat aici, eficientă pentru a „trata” o boală sau o tulburare la un

individ. În cazul unui cancer, cantitatea terapeutică eficientă de CoStAR sau compoziție cuprinzând un CoStAR așa cum a fost dezvoltată aici poate reduce numărul de celule de cancer; poate reduce mărimea sau greutatea tumorii; poate inhiba (adică, a încetini într-o anumită proporție, și de preferință a opri) infiltrarea celulelor de cancer în organele periferice; inhibă (adică, a încetini într-o anumită proporție, și de preferință a opri) metastaza tumorală; inhibă, într-o anumită proporție, creșterea tumorii; și/sau atenuează într-o anumită proporție unul sau mai multe dintre simptomele asociate cu cancerul. În măsura în care un CoStAR sau o compoziție cuprinzând un CoStAR așa cum a fost dezvoltat aici poate preveni creșterea și/sau poate omorî celulele canceroase existente, aceasta poate fi citotoxică și/sau citostatică. În unele aranjamente, cantitatea terapeutică eficientă este o cantitate inhibitoare a creșterii. În unele aranjamente, cantitatea terapeutică eficientă este o cantitate care îmbunătățește supraviețuirea lipsită de progres a unui pacient. În cazul unei boli infecțioase, cum ar fi o infecție virală, cantitatea terapeutică eficientă de CoStAR sau compoziție cuprinzând un CoStAR așa cum a fost dezvoltat aici poate reduce numărul de celule infectate de patogen; poate reduce producția sau eliberarea antigenilor derivați de la patogen; poate inhiba (adică, încetinește într-o anumită proporție, și de preferință oprește), răspândirea antigenilor derivați de la patogen; inhibă (adică, încetinește într-o anumită proporție, și de preferință oprește) răspândirea patogenului la celulele neinfectate; și/sau atenuează într-o anumită proporție unul sau mai multe simptome asociate cu infecția. În unele aranjamente, cantitatea terapeutică eficientă este o cantitate care prelungește supraviețuirea pacientului.

Celulele, incluzând celulele T și NK, care exprimă CoStARs pentru utilizare în metodele dezvoltării de față pot fi fie create ex vivo, fie de la sângele periferic al pacientului (autologe), sau în cadrul unui transplant de celule stem hematopoietice din sângele periferic al unui donor (alogene), sau din sângele periferic al unui donor neconectat (alogene). Ca alternativă, celulele T sau celulele NK pot fi derivate din diferențierea ex vivo al celulelor strămoș inductibile sau din celulele strămoș embrionare în celule T sau în celule NK. În aceste cazuri, celulele T care exprimă un CoStAR, și, opțional, un CAR și/sau TCR, sunt generate prin introducerea de ADN sau de ARN care codifică CoStAR, și, opțional, a unui CAR și/sau a unui TCR, printr-unul dintre multe mijloace incluzând transducția cu un vector viral, transfecția cu ADN sau cu ARN.

Celulele T sau NK care exprimă un CoStAR din invenția de față și, opțional, care exprimă un TCR și/sau un CAR, pot fi utilizate pentru tratamentul cancerelor hematologice sau al tumorilor solide.

O metodă de tratament al unei boli (nerevendicată) se referă la utilizarea terapeutică a unui vector sau a unei celule, incluzând o celulă T sau NK, din invenție. Din acest punct de vedere, vectorul, sau celula T sau NK pot fi administrate la un subiect care are o boală sau afecțiune existentă pentru a micșora, reduce sau îmbunătăți cel puțin un simptom asociat cu boala, și/sau a încetini, reduce sau bloca progresul bolii. Metoda poate cauza, sau promova, omorârea mediată de celulele T a celulelor canceroase. Vectorul sau celulele T sau NK în conformitate cu dezvoltarea de față pot fi administrate (nerevendicată) la un pacient cu unul sau mai mulți agenți terapeutici adiționali. Cel unul sau mai mulți agenți terapeutici pot fi co-administrați la pacient. Prin „co-administrare”, se înțelege administrarea unuia sau mai multor agenți terapeutici adiționali, și a vectorului, sau a celulelor T sau NK din invenția de față suficient de apropiat în timp încât vectorul, sau celulele T sau NK să poată amplifica efectul unuia sau mai multor agenți terapeutici adiționali, sau invers. În această privință, vectorii sau celulele pot fi administrați întâi, și cel unul sau mai mulți agenți terapeutici adiționali pot fi administrați apoi, sau invers. Ca alternativă, vectorii sau celulele, și cel unul sau mai mulți agenți terapeutici adiționali pot fi administrați simultan. Un agent terapeutic co-administrat care poate fi util este IL-2, deoarece aceasta este utilizată acum în terapiile celulare existente pentru a impulsiona activitatea celulelor administrate. Cu toate acestea, tratamentul cu IL-2 este asociat cu probleme de toxicitate și tolerabilitate.

După cum a fost menționat, pentru administrarea la un pacient, celulele efectoare CoStAR pot fi alogene sau autologe față de pacient. În anumite aranjamente, celulele alogene sunt modificate genetic suplimentar, de exemplu prin editare genică, astfel încât să se minimizeze sau să se prevină GVHD și/sau răspunsul imun al pacientului împotriva celulelor CoStAR.

Celulele efectoare CoStAR sunt utilizate pentru a trata cancerul și bolile neoplazice asociate cu un antigen țintă. Cancerul și bolile neoplazice care pot fi tratate utilizând oricare dintre metodele descrise aici includ tumori care nu sunt vascularizate, sau care nu sunt încă substanțial vascularizate, precum și tumorile vascularizate. Cancerul poate cuprinde tumorile non solide (cum ar fi tumorile hematologice, de exemplu, leucemiile și limfoamele), sau pot cuprinde tumorile solide.

Tipurile de cancer de tratat cu celule efectoare CoStAR din invenție includ, dar nu se limitează la, carcinomul, blastomul și sarcomul, și anumite leucemii sau malignități limfoide, tumori benigne și maligne, și malignități, de ex., sarcoamele, carcinoamele și melanoamele. Tumorile/cancerul de la adult și tumorile/cancerul pediatrice sunt incluse.

Cancerle hematologice sunt cancerle ale sângelui sau ale măduvei osoase. Exemple de cancerle hematologice (sau hematogene) includ leucemiile, incluzând leucemiile acute (cum ar fi leucemia limfocitară acută, leucemia mielocitară acută, leucemie mielogenă acută, și leucemia limfocitară cronică), policitemia vera, limfomul, boala Hodgkin, limfomul non Hodgkin (formele indolente și de grad înalt), mielomul multiplu, plasmacitomul, macroglobulinemia Waldenström, boala lanțului greu, sindromul mielodisplazic, leucemia cu celule păroase și mielodisplazia.

Tumorile solide sunt mase anormale de țesut care de obicei nu conțin chisturi sau zone lichide. Tumorile solide pot fi benigne sau maligne. Diferite tipuri de tumori solide sunt denumite după tipul de celule care le formează (cum ar fi sarcoame, carcinoame și limfoame). Exemple de tumori solide, cum ar fi sarcoamele și carcinoamele, includ carcinomul adrenocortical, colangiocarcinomul, fibrosarcomul, mixosarcomul, liposarcomul, condrosarcomul, osteosarcomul, și alte sarcoame, sinoviomul, mezoteliomul, tumorile Ewing, leiomiomasarcomul, rabdomiosarcomul, carcinomul de colon, cancerul de stomac, malignitatea limfoidă, cancerul pancreatic, cancerul de sân, cancerul de plămâni, cancerul ovarian, cancerul de prostată, carcinomul hepatocelular, carcinomul cu celule scvamatoase, carcinomul celulelor bazale, adenocarcinomul, carcinomul glandelor sudoripare, cancerul de tiroidă (de ex., carcinomul tiroidian medular și carcinomul tiroidian papilar), feocromocitoamele, carcinomul glandelor sebacee, carcinomul papilar, adenocarcinoamele papilare, carcinomul medular, carcinomul bronhogen, carcinomul celulei renale, hepatomul, carcinomul ductului biliar, coriocarcinomul, tumorile Wilms, cancerul cervical (de ex., carcinomul cervical și displazia cervicală pre-invasivă), cancerul anusului, al canalului anal sau al ano-rectului, cancerul vaginal, cancerul vulvei (de ex., carcinomul cu celule scvamatoase, carcinomul intraepitelial, adenocarcinomul, cancerul capului (de ex., carcinomul cu celule scvamatoase), cancerul gâtului, (de ex., carcinomul cu celule scvamatoase), cancerul testicular (de ex., seminomul, teratomul, carcinomul embrionar, teratocarcinomul, coriocarcinomul, sarcomul, tumorile celulei Leydig, fibromul, fibroadenomul, tumorile adenomatoide, și lipomul), carcinomul vezicii, cancerul de rinichi, melanomul, cancerul uterului (de ex., carcinomul endometrial), cancerul urotelial (de ex., carcinomul cu celule scvamatoase, carcinomul celulelor tranzitoriale, adenocarcinomul, cancerul ureterei, și cancerul vezicii urinare), și tumorile SNC-ului (cum ar fi un gliom, cum ar fi gliomul trunchiului cerebral și gliomurile mixte), glioblastomul (cunoscut de asemenea sub denumirea de glioblastom multiform), astrocitomul, limfomul SNC, germiomul, meduloblastomul, schwanomul, craniofaringiomul, menangiomi, neuroblastomul, retinoblastomul și metastazele cerebrale).

Atunci când "o cantitate imunologică eficientă," "o cantitate eficientă anti-tumorală," "o cantitate eficientă pentru inhibarea morții," sau "o cantitate terapeutică" este indicată, cantitatea preciză de compoziții din invenția de față de administrat (nerevendicată) poate fi determinată de un medic, cu luarea în considerare a diferențelor individuale de vârstă, greutate, mărime a tumorii, proporția de infecție sau de metastază, și starea pacientului (subiectului). Se poate afirma în general că o compoziție farmaceutică cuprinzând celulele T descrise aici poate fi administrată într-o doză de la 10^4 la 10^9 celule/kg de greutate corporală, în unele cazuri de la 10^5 la 10^6 celule/kg de greutate corporală, incluzând toate valorile întregi din aceste intervale. Compozițiile de celule T pot fi administrate de asemenea de mai multe ori în aceste doze. Celulele pot fi administrate prin utilizarea de tehnici de perfuzie care sunt cunoscute în mod obișnuit în imunoterapie (vezi, de ex., Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988).

Terapii combinate

O celulă care exprimă CoStAR descrisă aici poate fi utilizată în combinație cu alți agenți cunoscuți, și cu alte terapii cunoscute. Administrată „în combinație”, după cum se utilizează aici, înseamnă că două (sau mai multe) tratamente diferite sunt livrate subiectului în cursul afecțiunii subiectului cu tulburarea, de ex. cele două sau mai multe tratamente sunt livrate după ce subiectul a fost diagnosticat cu tulburarea, și înainte ca tulburarea să fi fost vindecată sau eliminată, sau tratamentul a încetat din alte motive. În anumite aranjamente (nerevendicată), livrarea unui tratament se produce încă atunci când livrarea celui de-al doilea începe, astfel încât există o suprapunere în termeni de administrare. La aceasta se face referire uneori aici sub denumirea de „livrare simultană” sau „livrare concurentă”. În alte aranjamente (nerevendicată), livrarea unui tratament se termină înainte ca livrarea celui alt tratament să înceapă. În anumite aranjamente (nerevendicată) în orice caz, tratamentul este mai eficient datorită administrării combinate. De exemplu, al doilea tratament este mai eficient, sau cel de-al doilea tratament reduce simptomele într-o proporție mai mare decât ar fi observată dacă al doilea tratament ar fi fost administrat în absența primului tratament, sau situația analoagă se observă cu primul tratament. În anumite aranjamente (nerevendicată), livrarea este astfel încât reducerea unui simptom, sau a unui alt parametru legat de tulburare este mai mare decât ceea ce ar putea fi observat cu un tratament livrat în absența celui alt. Efectul celor două tratamente poate fi potențial aditiv, total aditiv, sau mai mare decât aditiv. Livrarea poate fi astfel încât un efect al primului tratament livrat este încă detectabil atunci când cel de-al doilea este livrat.

O celulă care exprimă un CoStAR descrisă aici și cel puțin un agent terapeutic adițional, pot fi administrate (nerevendicat) simultan, în aceeași compoziție farmaceutică sau în compoziții farmaceutice separate, sau secvențial. Pentru administrarea secvențială (nerevendicat), celula care exprimă CAR descrisă aici poate fi administrată prima, și agentul adițional poate fi administrat al doilea, sau ordinea de administrare poate fi inversată.

Terapia cu CoStAR și/sau cu alți agenți terapeutici, proceduri sau modalități, pot fi administrate (nerevendicat) în timpul perioadelor de tulburare activă, sau în timpul unei perioade de remisiune sau de boală mai puțin activă. Terapia cu CoStAR poate fi administrată (nerevendicat) înainte de celălalt tratament, împreună cu tratamentul, post-tratament, sau în timpul remisiunii tulburării.

Atunci când se administrează în combinație (nerevendicat), terapia și agentul adițional (de ex., al doilea și al treilea agent), sau toți, pot fi administrat într-o cantitate sau doză care este mai mare, mai mică sau aceeași cu cantitatea sau doza din fiecare agent utilizați individual, de ex., sub formă de monoterapie. În anumite aranjamente (nerevendicat), cantitatea sau doza administrate de terapie cu CoStAR, de agent adițional (de ex., al doilea sau al treilea agent), sau toate, este mai mică (de ex., cel puțin 20%, cel puțin 30%, cel puțin 40%, sau cel puțin 50%) decât cantitatea sau doza din fiecare agent utilizat individual, de ex., sub formă de monoterapie. În alte aranjamente (nerevendicat), cantitatea sau doza de terapie CoStAR, agentul adițional (de ex., al doilea sau al treilea agent), sau toate, care au ca rezultat un efect dorit (de ex., tratamentul cancerului), este mai mică (de ex., cu cel puțin 20%, cel puțin 30%, cel puțin 40%, sau cel puțin 50% mai mică) decât cantitatea sau doza din fiecare agent utilizat individual, de ex., sub formă de monoterapie, necesară pentru a obține același efect terapeutic.

În aranjamente suplimentare, o celulă care exprimă CoStAR descrisă aici poate fi utilizată într-un regim de tratament (nerevendicat) în combinație cu intervenția chirurgicală, chemoterapia, radiația, agenții imunodepresivi, cum ar fi ciclosporina, azatioprina, metotrexatul, micofenolatul, și FK506, anticorpi, sau alți agenți imuno-ablativi, cum ar fi CAMPATH, anticorpi anti-CD3 sau alte terapii cu anticorpi, citoxină, fludarabină, ciclosporină, FK506, rapamicină, acid micofenolic, steroizi, FR901228, citokine și iradiere, vaccinuri peptidice, cum ar fi cel descris în Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971.

În anumite aspecte, compușii din invenția de față sunt combinați cu alți agenți terapeutici, cum ar fi alți agenți anti-cancer, agenți antialergici, agenți anti-greață (sau antiemetice), agenți de calmare a durerii, agenți citoprotectori, și combinații ale acestora.

Într-un aranjament, o celulă care exprimă CoStAR descrisă aici poate fi utilizată în combinație cu un agent chemoterapeutic. Agenți chemoterapeutici exemplari includ o antraciclină (de ex., doxorubicină (de ex., doxorubicină lipozomală)), un alcaloid din vinca (de ex., vinblastină, vincristină, vindesină, vinorelbina), un agent alchilant (de ex., ciclofosfamidă, dacarbazină, melfalan, ifosfamidă, temozolomidă), un anticorp anti-celulă imună (de ex., alemtuzamab, gemtuzumab, rituximab, ofatumumab, tositumomab, brentuximab), un antimetabolit (incluzând, de ex., antagoniști ai acidului folic, analogi ai pirimidinei, analogi ai purinei, și inhibitori ai adenozin deaminazei (de ex., fludarabină)), un inhibitor al mTOR, un antagonist al proteinei legate de TNFR indus de TNFR glucocorticoid (GITR), un inhibitor al proteazomului (de ex., aclacinomicina A, gliotoxina sau bortezomib), un imunomodulator cum ar fi talidomida sau un derivat de talidomidă (de ex., lenalidomida).

Agenții chemoterapeutici generali pentru utilizare în terapiile combinate includ busulfan (Myleran®), busulfan injecție (Busulfex®), cladribină (Leustatin®), ciclofosfamidă (Citoxan® sau Neosar®), citarabină, citozină arabinozidă (Citosar-U®), injecție cu lipozomi de citarabină (DepoCit®), clorhidrat de daunorubicină (Cerubidine®), injecție cu lipozomi cu citrat de daunorubicină (DaunoXome®), dexametazonă, clorhidrat de doxorubicină (Adriamicin®, Rubex®), etopozid (Vepesid®), fosfat de fludarabină (Fludara®), hidroxiuree (Hidrea®), idarubicină (Idamicin®), mitoxantronă (Novantrone®), Gemtuzumab Ozogamicin (Milotarg®).

Agenții chemoterapeutici generali considerați pentru utilizare în terapiile combinate includ anastrozol (Arimidex®), bicalutamidă (Casodex®), sulfat de bleomicină (Blenoxane®), busulfan (Mileran®), busulfan injecție (Busulfex®), capecitabină (Xeloda®), N4-pentoxycarbonil-5-deoxi-5-fluorocitidină, carboplatină (Paraplatin®), carmustină (BiCNU®), clorambucil (Leukeran®), cisplatină (Platinol®), cladribină (Leustatin®), ciclofosfamidă (Citoxan® sau Neosar®), citarabină, citozină arabinozidă (Citosar-U®), injecție cu lipozomi de citarabină (DepoCit®), dacarbazină (DTIC-Dome®), dactinomycină (Actinomycin D, Cosmegen), clorhidrat de daunorubicină (Cerubidine®), injecția cu lipozomi de citrat de daunorubicină (DaunoXome®), dexametazonă, docetaxel (Taxotere®), clorhidrat de doxorubicină (Adriamicin®, Rubex®), etopozid (Vepesid®), fosfat de fludarabină (Fludara®), 5-fluorouracil (Adrucil®, Efudex®), flutamidă (Eulexin®), tezacicitină, gemcitabină (difluorodeoxicitidină), hidroxiuree (Hidrea®), idarubicină (Idamicin®), ifosfamidă (IFEX®), irinotecan (Camptosar®), L-asparaginază (ELSPAR®), leucovorină de calciu, melfalan (Alkeran®), 6-mercaptopurină (Purineto®), metotrexat (Folex®), mitoxantronă (Novantrone®), milotarg, paclitaxel (Taxol®), foenix (Itrium90/MX-DTPA), pentostatină,

polifeprosan 20 cu implant de carmustină (Gliadel®), citrat de tamoxifen (Nolvadex®), tenipozidă (Vumon®), 6-tioguanină, tiotepa, tirapazamină (Tirazone®), clorhidrat de topotecan pentru injecție (Hicamptin®), vinblastină (Velban®), vincristină (Oncovin®), și vinorelbina (Navelbine®).

Tratamentele pot fi evaluate, de exemplu, prin regresia tumorii, greutatea tumorii sau micșorarea mărimii, timpul până la progres, durata de supraviețuire, supraviețuirea lipsită de tumoare, rata totală de răspuns, durata răspunsului, calitatea vieții, exprimarea proteinelor și/sau activitatea acestora. Abordările pentru a determina eficacitatea terapiei pot fi utilizate, incluzând, de exemplu, măsurarea răspunsului prin imagistică radiologică.

EXEMPLE

Exemplul 1 – Producția celulelor care exprimă CoStAR

Materiale și metode

Proiectarea constructului – CoStAR MFE23 constă din o secvență de nucleotide dintr-un fragment de anticorpi cu un singur lanț derivat de la MFE23 cu o secvență lider M1 de oncostatină fuzionată cu întreaga secvență de acizi nucleici a CD28 umane. Secvenței de nucleotide a CoStAR i-au fost optimizați codonii și genele i-au fost sintetizate de Genewiz Inc. Construcții au fost clonați în pSF.Lenti (Oxford Genetics) printr-un situs XbaI și NheI.

Producția lentivirală – producția lentivirusului a fost realizată utilizând un sistem de ambalare cu trei plasmide (Cell Biolabs, San Diego, USA) prin amestecarea a 10 μg din fiecare plasmidă, plus 10 μg de plasmidă lentivirală pSF.Lenti conținând transgena, împreună în RPMI lipsit de ser conținând 50 mM CaCl₂. Amestecul a fost adăugat în picături la un monostrat cu confluență 50% de celule 293T în flacoane de 75 cm². Supernatantele virale au fost colectate la 48 și 72 de ore post transfecție, adunate și concentrate utilizând soluția de concentrație de supernatant lentiviral LeniPac (GeneCopoeia, Rockville, Maryland, USA) în conformitate cu instrucțiunile fabricantului. Supernatante lentivirale au fost concentrate de 10 ori și utilizate pentru a infecta direct celule T umane primare în prezența a 4 μg/ml de polibren (Sigma-Aldrich, Dorset, UK). Celule mononucleare din sângele periferic au fost izolate de la donori sănătoși normali înainte de activarea timp de 24 de ore cu perle de activare și expansiune a celulelor T (Invitrogen) în conformitate cu instrucțiunile fabricantului înainte de adăugarea supernatantelor lentivirale.

Transducția celulelor a fost evaluată la 96 de ore post infecție utilizând proteină

CEA.hFc și anticorpi anti-hFc-PE secundar, plus anti-CD34-APC, sau cu anticorp anti-CD34-PE singur. Celulele au fost apoi expandate suplimentar, utilizând alimentatoare PBMC iradiate nepotrivite donor x10 la un raport de 1:20-1:200 în RPMI + 10% FCS cu adăugarea a 1 μg/ml PHA și 200 IU/ml IL-2. După 14 zile, celulele au fost colorate ca mai înainte și depozitate gata pentru analiză.

Analizele de funcționalitate au fost executate prin amestecarea unor celule CoStAR pozitive și negative cu celule LoVo sau LS174T pozitive față de CEA manipulate OKT3 sau de tip sălbatic. Pe scurt, celulele T au fost amestecate cu celule LoVo în diferite rapoarte, în plăci cu 96 de godeuri, și IFNγ sau IL-2 au fost măsurate prin ELISA. Celulele rămase au fost incubate cu o diluție de 1:10 de reactiv WST-1 (Sigma, UK), timp de 30 de minute înainte de citirea absorbției la 450 nm. % de citotoxicitate a fost determinat utilizând următoarea ecuație = $100 - ((\text{citirea experimentală} - \text{celulele T singure}) / (\text{doar tumoarea})) \times 100$.

Analizele de proliferare au fost executate prin încărcarea întâi a celulelor T cu 10 μM de colorant de proliferare eFluor450 (eBioscience, UK) timp de 10 min la 37°C la o concentrație de 1×10^7 celule/ml înainte incubării celulelor în 5 volume de mediu pentru celule T timp de 5 minute pe gheață. Celulele au fost spălate excesiv pentru a îndepărta colorantul nelegat, și adăugate la co-culturi care conțin celule tumorale. Celulele au fost îndepărtate la 2, 6 și 10 zile, diluție de 1:200 de DRAQ7 adăugat, și celulele au fost analizate utilizând un citometru MACSQuant și un software MACSQuantify.

Numărătoarea celulelor pentru analizele de proliferare a fost realizată prin luarea celulelor din godeuri și colorarea cu anticorp anti-CD2 PerCP eFluor710 (eBioscience, UK) timp de 20 min în întuneric, urmată de colorarea cu DRAQ7, și numărătoarea a fost realizată utilizând un analizor MACSQuant.

Rezultate – celule T umane primare au fost izolate din supernatante leuco-trombocitare obținute de la NHSBT. Celulele T au fost izolate prin izolare mediată Ficoll și truse de izolare negative față de celulele T (StemCell Technologies). Celulele T izolate au fost activate cu perle de activare și expansiune a celulelor T (Invitrogen, UK). Celulele au fost incubate cu particule lentivirale concentrate, și expandate timp de mai multe zile. Lentivirusurile au conținut secvența de ADN a constructului MFE.CoStAR.2A.tCD34 (MFE23.scFv fuzionat cu CD28 umană de lungime completă co-exprimit cu CD34 umană trunchiată printr-o secvență de clivaj 2A). Celulele transduse cu succes au fost expandate suplimentar utilizând alimentatoare iradiate, așa cum a fost subliniat în materiale și metode. Transducția donorului 1 a fost măsurată la 22,69% (17,15 CD34+/CoStAR+ plus 5,53% CD34-/CoStAR+), donorul 2 a fost măsurat la 20,73%, și donorul 3 la 13,34%. Celulele au fost îmbogățite pentru exprimarea CoStAR

utilizând anticorpi anti-CD34, pentru a obține populații de celule T mai mult de 90% pozitive pentru CoStAR.

Pentru a genera un model in vitro fiziologic relevant pentru a testa impactul CoStAR asupra activității celulelor T, celulele transduse și netransduse au fost testate față de liniile de celule tumorale LoVo și LS174T CEA+. Pentru a permite activarea celulelor T ca răspuns la liniile de tumoare nepotrivite, am manipulat celulele tumorale să exprime fragmentul de anticorp cu un singur lanț anti-CD3 ancorat la membrana celulară, prin intermediul domeniului transmembranar sintetic și a fost despărțit de gena marker GFP utilizând un element IRES, pentru a vizualiza celulele transduse utilizând citometria în flux.

Clone de celule unice de LoVo și LS174T au fost generate din transfectanți vrac. Celulele T netransduse și celulele T transduse cu CoStAR au fost amestecate la diferite rapoarte efector: țintă cu celule LS174T sau LoVo manipulate cu OKT3 sau netransduse de tip sălbatic. După 24 de ore, mediu de co-cultură a fost luat pentru măsurarea prin ELISA a IL-2. Secreția dependentă de activare a IL-2 de la populațiile de celule T CoStAR+ și CoStAR- de la trei donori ca răspuns la celulele LS174T manipulate cu OKT3, cu secreție de IL-2 doar de fond a fost văzută pentru celulele T transduse și netransduse ca răspuns la celulele tumorale nemanipulate (Fig. 3 A-C). Secreția de IL-2 amplificată de CoStAR față de celulele tumorale manipulate cu OKT3 a fost găsită la toți cei trei donori testați. Efectul a fost cel mai evident la rapoarte de 8:1 și 16:1, și la rapoarte mai mari E:T secreția de IL-2 a fost prea mică pentru a fi măsurată cu acuratețe. La rapoarte mai mici dintre celulele efectoare și țintă, s-a văzut că secreția a fost de saturare pentru celulele netransduse. Aceste observații au fost repetate la celulele LoVo cu doi dintre trei donori testați față de LS174 cu rezultate similare (Fig. 3D & E).

Pentru a determina impactul CoStAR asupra exprimării celulelor T, celule T transduse sau netransduse au fost amestecate cu celule LoVo manipulate cu OKT3-GFP sau de tip sălbatic, numărul total de celule după trei zile a fost numărat. CoStAR a îmbunătățit supraviețuirea și/sau proliferarea celulelor T manipulate ca răspuns la LoVo-OKT3, dar nu a celulelor LoVo de tip sălbatic în prezență de IL-2 (Fig. 4A) și în absență de IL-2 (Fig. 4B). Pentru a investiga suplimentar acest fenomen, analiza proliferării celulelor a fost realizată în celule T de la doi donori utilizând colorant de proliferare, pentru a număra ciclurile celulare prin care fiecare populație a trecut timp de 6 zile (Fig. 4C & D). O populație mai mare de celule manipulate cu CoStAR a trecut prin 5, 6 sau 7 cicluri de proliferare timp de 6 zile, comparativ cu celulele nemanipulate, ca răspuns la LoVo-OKT3, în timp ce celulele transduse cu CoStAR și netransduse cu CoStAR au trecut prin o medie de aproximativ 2 cicluri pe aceeași durată ca răspuns la LoVo de tip sălbatic.

O varietate de receptori de fuziune constând din CD28 fuzionat cu un domeniu costimulator adițional N terminal a fost generată. Domeniile costimulatoare obținute de la: CD137, CD2, CD29, CD134, CD150, CD40, GITR și domeniul de semnalizare de la lanțul gama al receptorului IL-2 (IL2Ry) au fost alese. Un receptor la fel de apropiat cu cel utilizat în studiile anterioare de costimulare inductibilă a fost inclus. Acest receptor desemnat CD28(IEV) este trunchiat astfel încât motivul C terminal al CD28 să fie triada de aminoacizi „IEV”. Secvențele au fost generate de novo de Genewiz și clonate într-un vector lentiviral sub un promotor EF1, împreună cu o genă marker CD34 separată de CoStAR de fuziune printr-o peptidă cu auto-clivare 2A. Celulele T CD8+ primare au fost izolate utilizând perle EasySep (StemCell Technologies) și activate cu Dynabeads, de activare /expansiune anti-CD3/anti-CD28 înainte de adăugarea de particule lentivirale. După o scurtă perioadă de expansiune, celulele au fost amestecate cu celule LoVo sau LoVo-OKT3, cu includerea de anticorpi anti-CD107a brefeldină și monensină, și urmată de o incubare de 16 ore au fost fixate și colorate cu anticorpi față de gena marker (CD34), precum și cu anticorpi față de IL-2, IFN γ și bcl-xL. Analiza a fost realizată utilizând un analizor MACSQuant și un software MACSQuantify. Fig. 5 arată răspunsul IL-2 de la CD34- (netransduse cu CoStAR) și CD34+ (transduse cu CoStAR). Analiza statistică a demonstrat că toți receptorii testați au indus o creștere semnificativă a proporției de celule care produs IL-2, atunci când poartă receptori CoStAR variantă. Celelalte citiri au fost măsurate în paralel: IFN γ , o citokină eliberată în condiții normale de semnal 1, dar amplificate prin costimulare; CD107A, un marker al degranulării; și bcl-xL, o proteină anti-apoptotică reglată în sus de costimulare. Angajarea CoStAR a îmbunătățit toate funcțiile efectoare analizate, cu grade diferite. Receptorii de fuziune CD28.CD2 și CD28.CD40 se pare că provoacă cel mai robust răspuns dintre toți receptorii testați (vezi Fig. 6)

Exemplul 2

Efectele CoStAR pe bază de CD28 și CD28.CD40 asupra secreției de citokine pe bază de populație au fost comparate. Celule T primare de la trei donori au fost transduse cu CoStAR trunchiat CD28(IEV), CoStAR CD28 de lungime completă sau cu CoStAR CD28.CD40 (având CD28 de lungime completă așa cum a fost arătat în SEQ ID NO. 10, dar care nu are resturile N și K N terminale), sau au fost lăsate netransduse. Celulele T au fost îmbogățite în exprimarea CoStAR utilizând gena marker CD34, și după expansiune celulele au fost amestecate cu celule LoVo-OKT3 și secreția de IL-2 a fost analizată prin ELISA (vezi Fig. 7). Celulele netransduse au produs, în medie, 0,80 ng/ml IL-2, cu CD28(IEV) și CD28 CoStAR

de lungime completă producând 4,6 și 5,0 ng/ml IL-2 respectiv. Cu toate acestea, CD28.CD40 a indus 29,0 ng/ml IL-2 în medie pentru trei donori, demonstrând astfel un beneficiu clar al încorporării CD40 în CoStAR pe bază de CD28 de bază.

Apoi, efectul CoStAR asupra expansiunii celulelor T a fost analizat. Celule T de la șapte donori au fost transduse cu CoStAR CD28 sau cu CoStAR CD28.CD40, cu scFv de receptor anti-folat (MOV-19) sau anti-CA-125, sau cu un domeniu de legare a antigenului al peptidei receptoare anti-folat (C7). Celule adiționale au fost transduse cu un CoStAR CD28 care poartă un scFv anti-CEA ca martor nepotrivit. Celulele au fost apoi amestecate cu o linie de celule CA125+/receptor folat +/CEA- OvCAR3, manipulate pentru a exprima OKT3 legat la membrană (OvCAR-OKT3). Numărul de celule T a fost determinat după 7, 14 și 21 zile, și OvCAR-OKT3 proaspete adăugate în zilele 7, și 14. Expansiunea limitată a celulelor care poartă scFv anti-CA125 a fost observată (de câte ori expansiune, media: CD28: 15,1; CD28.CD40: 69,1); cu toate acestea, celulele care țintesc receptorul pentru folat cu un dcGv s-au expansionat în ambele cohorte CD28 și CD28.CD40 (de câte ori expansiune: CD28: 186,7; CD28.CD40: 1295,0). O expansiune mai limitată a fost observată atunci când peptida C7 a fost utilizată pentru a ținti receptorul folatului (de câte ori expansiune: CD28: 71,5; CD28.CD40: 28,0). Receptorul mator de țintire a CEA a demonstrat o expansiune limitată (de câte ori expansiune: 28,0).

Pentru a înțelege mai bine sinergia semnalului 1 și a semnalului 2, celulele T au fost manipulate cu un TCR modificat cu domeniul constant murin, care recunoaște o peptidă CEA (691-699) în contextul HLA-A*02, precum și cu CoStAR CD28 sau CD28.CD40 țintiți către proteina CEA de suprafață celulară. Ca martor, celulele au fost de asemenea transduse cu un CoStAR CD28 specific pentru TCA125. Celulele T au fost amestecate cu celule HLA-A*02+/CEA+ H508 și producția de citokine a fost analizată prin colorare de citometrie în flux. Gating-ul de citometrie în flux a fost executat utilizând anticorpi dirijați împotriva domeniului constant murin TCRβ (marchează celulele TCR manipulate), precum și eticheta de epitop DYKDDDDK (SEQ ID NO: 14) (marchează celulele manipulate cu CoStAR). Astfel, a fost posibil să se analizeze celulele TCR-/CoStAR-, TCR+/CoStAR-, TCR-/CoStAR+ și TCR+/CoStAR+ în fiecare godeu de cocultură. Producția de citokine a fost apoi reprezentată grafic în fiecare subpopulație, fie în celulele T CD4+, fie în celulele T CD8+. În celulele CD4+, CoStAR CD28.CD40 a amplificat producția de CD137 și TNFα peste doar stimularea cu TCR; cu toate acestea, răspunsul TCR în celulele CD4+ a fost slab datorită dependenței TCR de CD8. În celulele CD8+, a existat o activitate efectorie mai robustă cu IL-2 și CD107a, arătând în special o inducție mai puternică în grupele CoStAR CD28.CD40. Pentru a compara mai bine receptorii, activitatea efectorie doar în grupele TCR+/CoStAR+ a fost reprezentată grafic în celulele CD4+ și CD8+ (Fig. 10). În celulele CD4+, inducția CD137 a fost semnificativ amplificată de CD28.CD40 comparativ cu CoStAR CD28 comparativ cu CEA sau cu țintirea nepotrivită a CoStAR CD28. În celulele CD28+, inducția CD137 a fost semnificativ crescută comparativ cu CEA sau cu țintirea nepotrivită a CoStAR CD28, în timp ce inducția CD107 a fost crescută comparativ cu martorul CoStAR. Astfel CD28.CD40 prezintă activitate efectorie amplificată într-un interval larg de modele și activități efectorie.

Referințe

Alvarez-Vallina L, Hawkins RE. Eur J Immunol. 1996 Oct;26(10):2304-9. Antigen-specific targeting of CD28-mediated T cell co-stimulation using chimeric single-chain antibody variable fragment-CD28 receptors.

Bridgeman JS, Hawkins RE, Bagley S, Blaylock M, Holland M, Gilham DE. J Immunol. 2010 Jun 15;184(12):6938-49. The optimal antigen response of chimeric antigen receptors harboring the CD3zeta transmembrane domain is dependent upon incorporation of the receptor into the endogenous TCR/CD3 complex.

Govers C, Sebestyén Z, Roszik J, van Brakel M, Berrevoets C, Ször A, Panoutsopoulou K, Broertjes M, Van T, Vereb G, Szöllosi J, Debets R. J Immunol. 2014 Nov 15;193(10):5315-26. TCRs genetically linked to CD28 and CD3ε do not mispair with endogenous TCR chains and mediate enhanced T cell persistence and anti-melanoma activity.

Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, Teachey DT, Chew A, Hauck B, Wright JF, Milone MC, Levine BL, June CH. N Engl J Med. 2013 Apr 18;368(16):1509-18. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia.

Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, Somerville RP, Carpenter RO, Stetler-Stevenson M, Yang JC, Phan GQ, Hughes MS, Sherry RM, Raffeld M, Feldman S, Lu L, Li YF, Ngo LT, Goy A, SA, Rosenberg SA. Science. 2006 Oct 6;314(5796):126-9. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes.

Krause A, Guo HF, Latouche JB, Tan C, Cheung NK, Sadelain M. J Exp Med. 1998 Aug 17;188(4):619-26. Antigen-dependent CD28 signaling selectively enhances survival and proliferation in genetically modified activated human primary T lymphocytes.

Lanitis E, Poussin M, Klattenhoff AW, Song D, Sziatopoulos R, June CH, Powell DJ Jr., Cancer Immunol Res. 2013 Jul;1(1):43-53. Chimeric antigen receptor T Cells with dissociated signaling domains exhibit focused antitumour activity with reduced potential for toxicity in vivo.

Rapoport AP, Stadtmauer EA, Binder-Scholl GK, Goloubeva O, Vogl DT, Lacey SF, Badros AZ, Garfall A, Weiss B, Finklestein J, Kulikovskaya I, Sinha SK, Kronsberg S, Gupta M, Bond S, Melchiori L, Brewer JE, Bennett AD, Gerry AB, Pumphrey NJ, Williams D, Tayton-Martin HK, Ribeiro L, Holdich T, Yanovich S, Hardy N, Yared J, Kerr N, Philip S, Westphal S, Siegel DL, Levine BL, Jakobsen BK, Kalos M, June CH. Nat Med. 2015 Aug;21(8):914-21. NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumour effects in myeloma.

Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, Citrin DE, Restifo NP, Robbins PF, Wunderlich JR, Morton KE, Laurencot CM, Steinberg SM, White DE, Dudley ME. Clin Cancer Res. 2011 Jul 1;17(13):4550-7. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy.

SECVENȚE

SEQ ID NO:1: Întregul transcript de mARN CD28 umană cu cadrul de citire descris subliniat cu aldine.

mARN liniar de 4900 bp LOCUS NM_006139 4900 PRI 07-OCT-2016

DEFINIȚIE molecula C28 Homo sapiens (CD28), varianta de transcript 1, mARN.

ACCESSION NM_006139

ORIGINE

1 taaagtcac aaaacaacgt tatacctgt gtgaaatgct gcagtcagga tgccttggg
61 tttagtgcc ttgatcatgt gccctaagg gatggtggcg gtggtgggg ccgtggatga
121 cggagactct caggcccttg cagggtgcgc ttcagtlcc cclcacactl cgggtlccle
181 ggggaggagg ggctggaacc ctgcccac gtcaggacaa agatgctcag gctgctcttg
241 gctctcaact tatteccctt aattcaagta acaggaaaca agattttggt gaagcagtcg
301 cccatgcttg tagcgtacga caatgaggc aaccttagct gcaagtatct ctacaatctc
361 ttctcaaggg agttcggggc atcccttcac aaaggactgg atagtgtgtt ggaagtctgt
421 gttgtatatg ggaattactc ccagcagctt caggttfact caaaaacggg gttcaactgt
481 gatgggaaat tgggcaatga atcagtgaca ttctacctec agaatttgta tgtaaccaa
541 acagatattt acttetgcaa aattgaagtt atgtatcctc ctcttacct agacaatgag
601 aagagcaatg gaaccattat ccatgtgaaa gggaaacacc ttgtccaag tccctattt
661 cccggacctt ctaagccctt ttgggtgctg gtgggtggtg gtggagtcct ggcttgctat
721 agcttgctag taacagtggc ctttattatt ttctgggtga ggagtaagag gagcagctc

781 ctgcacagtg actacatgaa catgactccc cgcgcgcccg ggcccacccg caagcattac
 841 cagccctatg ccccaccacg cgacttcgca gcctatcgct cctgacacgg acgcclatcc
 901 agaagccagc cggcctggcag ccccacatcg ctcaatalca ctgcctcggg taggaaatga
 961 ccgccatcgc cagccgggcca cctcaggecc ctgttgggccc accaatgcca attttctcgc
 1021 agtgactaga ccaaatatca agatcatlil gagactctga aatgaagtaa aagagatlilc
 1081 ctgtgacagg ccaagictla cagtgccatg gccccacatl ccaactlacc tgtacttagt
 1141 gacttgactg agaagftagg gtagaaaaca aaaagggagt ggattctggg agcctcttcc
 1201 ctttctcact cactgcaca tctcagtcaa gcaaagtgtg gtatccacag acattttagt
 1261 tgcagaagaa aggctaggaa atcattcctt ttggftaaat ggggtgttaa tcttttggtt
 1321 agtgggttaa acggggtaag ttagagtagg gggagggata ggaagacata ttaaaaaacc
 1381 attaaaacac tgcicccac tcatgaaalg agccacgtag ttcclattla atgcigtltl
 1441 cctttagtlit agaaalacat agacattgtc lllalgaal lctgalcata tllagtcalt
 1501 ttgaccaaal gagggalitg gtcaaatgag ggatlccctc aaagcaatal cagglaaacc
 1561 aagttgctlt cctcactccc tgtcatgaga cttcagtgtt aatgttcaca atatacttcc
 1621 gaaagaataa aatagtctc ctacatgaag aaagaatatg tcaggaaata aggtcacttt
 1681 atgtcaaat tatttgagta ctatgggacc tggcgagtg gctcatgctt gtaatccag
 1741 cactttggga ggccgaggtg ggcagatcac ttgagatcag gaccagcctg gtcaagatgg
 1801 tgaactccg tctglaclaa aaalacaaa tttagcttgg cctgggtggca ggcacctgla
 1861 atcccagctg cccaagaggc tgaggcalga gaatcgcttg aacctggcag gcggagggttg
 1921 cagttagccg agatagtgc acagctcctc agcctgggag acagagttag aclecatctc
 1981 aaacaacaac aacaacaaca acaacaaca caaaccacaa aattatttga gtactgtgaa
 2041 ggattatlil tctaacagtl catccaalc agaccaggta ggagcttccc tgttccatal
 2101 gtttcagggt tgcacagtg gtctctttaa tgtcgggtg gagatccaaa gtgggtgtg
 2161 gaaagagcgt ccataggaga agtgagaata ctgtgaaaaa gggatgttag cattcattag
 2221 agtatagga tgagtccaa gaaggttctt tggagggagg acgaatagaa tggagtaatg
 2281 aaattcttc catgtctga ggagatagcc agcattaggt gacaattctc cagaagtgtt
 2341 caggcagaag gtgccctggt gagagctcct ttacagggac ttatgtgtt ttagggtca
 2401 gagctccaaa actctgggct cagctgtccc tgtaccttgg aggtccatc acatgggaaa
 2461 gtattttgga atgtgtctt tgaagagagc atcagagttc ttaaggagct gggtaaggcc
 2521 tgaccctgaa atgaccatgg atattttct acctacagtt tgagteaact agaatatgcc
 2581 tggggacctt gaagaatggc ccttcagtg cctcaccat ttgtcatgc ttcagttaat
 2641 tcaggltgtg aaggagctla ggttttagag gcacgtagac ttggttcaag tctcgttagt
 2701 agttgaatag cctcaggcaa gtcactgccc acctaatag atggttctc aactataaaa
 2761 tggagataat ggttacaat gtctcttct atagtataat ctccataagg gcatggccca

2821 agtctgtctt tgactctgcc tatecctgac atttagtagc atgccccaca tacaatgta
 2881 gctattggta ttattgcat atagataaat tatgtataaa aattaaactg ggcaatagcc
 2941 taagaagggg ggaatatgtt aacacaaatt taaaccact acgcagggat gaggtgctat
 3001 aatatgagga ccttttaact tccatcatit tctgtttct tgaatagt ttatctgtaa
 3061 tgaatataa ggcacctccc acttttatgt atagaagag gtcctttaat tttttttaa
 3121 tgtgagaagg aaggaggag taggaatct gagattccag atcgaaaata ctgtacttg
 3181 gttgatttt aagtgggctt ccattccatg gatttaata gtccaagaa gatcaaac
 3241 agcagtactt ggggtctgaa gaactgttg attaccctg gcacgtgtgc cactgccag
 3301 ctcttgggc acacagagtt ctcaatcca agttalcaga ttglatlga aatgacaga
 3361 gctggagagt ttttgaat ggcatggca aataaataa tactttttt taaatgaaa
 3421 gactgtatct atgtaataa atgattttgt ttctgactg gaaaaatagg cctactaaag
 3481 atgaatcaca ctgagatgt ttctactca ctctgcacag aaacaagaa gaaatgtat
 3541 acagggaggt ccgtttcac lallaglatg aaccaagaa tggltcaaaa acatggtag
 3601 gagcaatgct ttcatagtt cagatatgtt agttatgaag aaaacaatgt cattgtctgc
 3661 tattattgta agagtcttat aattaatgtt actcctataa ttttgattg tgagctcac
 3721 tatttgggtt aagcatgcca atttaagag accaagtga tttacattat gttctacata
 3781 ttcatgata aaattactaa actactatat gtcgtctta aattgtact ttaatatgt
 3841 ctlttggat taagaaagat atgcttcag aatagatag ctctgcttg gcaaggaat
 3901 tggalagaac ttgclatla aaagagggtt ggggtlaaac ctgtlataa tctccagtt
 3961 agcctttttt gaaaaagcta gacttcaaa tactaatttc actcaagca gggtagcttt
 4021 ctgtgtttgt tcttgactt cagtcacaat ttctatcag accaatggct gacctcttg
 4081 agatgicagg ctaggcttac ctatgttgc tgtgtcatg gaatgctgag aagttgaca
 4141 gagatccaac ttagecctg accccatcag tccctgggt taactaacg agccaccgg
 4201 cctcatggct atttaatga gggtaattg ggttaaatgc atgtctgac cctatccca
 4261 gccatttga ctgccagctg ggaactatac cagacctgga tactgatecc aaagtgtta
 4321 attcaactac atgctggaga tttagatgg tggcaataaa ggaccagaa ccagatctt
 4381 gattgtata gactlataa laatccaggt caaagagag gacacacact ctctcaagac
 4441 ctgggtgtgag gtagtctgt ttatctgcaa ggccattga ggcacagaa gtctctctt
 4501 cctatagata tatgcatact ttctacata taggaatgta ttaggaatac tcaaccata
 4561 cagcatgtt cctacctag ggcctttaca tctctgttt actctgteta gaatgtcct
 4621 ctgtagatga cctggcttg cctgtcacc ttcatgtct tctcaagtg tcatctctc
 4681 cctagttaa actacccac accctgtct ctctcttgc ttattttct ccatagcat
 4741 ttaccatctc ttacattaga cattttctt atttattgt agttataag ctcatgagg
 4801 caagtaactt tctttgtt ctgtctgtat ctccagtgc cagagcagt cctgttat

4861 aataaatatt tattgactga gtgaaaaaaa aaaaaaaa//

SEQ ID NO:2: Secvența proteinei CD28 umane cu:

- 5 I. peptida de semnal subliniată cu aldine (aceasta poate fi deletată din secvență atunci când este utilizată în conformitate cu invenția); și
- II. regiunea transmembranară subliniată; și
- III. regiunea extracelulară stă între peptida de semnal și regiunea transmembranară și regiunile citoplasmice urmează regiunea transmembranară; și

IV. regiunile în cutie reprezintă primii 5 aminoacizi ai proteinei mature care pot fi prezenți sau absenți sau mutați în orice aspect al invenției. De asemenea, 1, 2, 3, 4, sau 5 dintre aceste resturi (adică N, K, I, L sau V) pot fi delete din secvență atunci când sunt utilizate în conformitate cu invenția.

MLRLLALNLFPSIQVTG**NKILV****KQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLH**
KGLDSAVEVCVVYGNYSQQLQVYSKTGFNC DGKLGNESVTFYLQONLYVNQTDIYF
CKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLL
 5 **VTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS**

SEQ ID NO: de la 3 la 12 de mai jos sunt secvențe exemplare ale domeniilor de semnalizare ale CoStAR care pot fi fuzionate cu proteina CD28 umană în regiunea din cutie a SEQ ID NO:2 (care poate fi mutată sau poate să nu fie mutată, dar pentru simplitatea diagramei, a fost lăsat sub forma originală a acesteia), cu:

- 10 I. regiunea subliniată dublu reprezintă regiunea derivată de la CD28; și
 II. regiunea subliniată este o a doua regiune derivată de la receptorul costimulator; și
 III. secvența cu italice este o a treia regiune derivată de la receptorul costimulator.
 Se observă că regiunea din cutie reprezintă primii 5 aminoacizi ai proteinei CD28 mature, care pot fi prezenți sau absenți sau mutați în orice aspect al acestei invenții. De asemenea, 1, 2, 3, 4, sau 5 dintre
 15 aceste resturi (adică, N, K, I, L sau V) pot fi delete din secvență atunci când sunt utilizate în conformitate cu invenția.

SEQ ID NO:3: Variantă trunchiată a domeniului citoplasmatic al CD28

NKILV**KQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQ**
QLQVYSKTGFNC DGKLGNESVTFYLQONLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNG
TIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKR

20 SEQ ID NO:4: Fuziune CD28.CD137

NKILV**KQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQ**
QLQVYSKTGFNC DGKLGNESVTFYLQONLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNG
TIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLH
SDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS/RFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPV
QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE

SEQ ID NO:5: Fuziune CD28.CD134

NKILV**KQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQ**
QLQVYSKTGFNC DGKLGNESVTFYLQONLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNG
TIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLH
SDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS/RDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQ
EEQADAHSTLAKI

25 SEQ ID NO:6: Fuziune CD28.CD2

NKILV**KQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQ**
QLQVYSKTGFNC DGKLGNESVTFYLQONLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNG
TIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLH
SDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS/KRKKQRSRRNDEELETRAHRVAT
EERGRKPHQIPASTPQNPA TSQHPPPPGHR SQAPSHRPPPPGHRVQHQPQKRPPAPS
GTOVHQQKGPPLP RPVQPKPPHGAAENSLSPSSN

SEQ ID NO:7: Fuziune CD28.CD29

NKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQ
QLOVYSKTGFNC DGKLGNESVTFYLONLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNG
TIHVKGKHLCPSPLEPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLH
SDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS/KLLMIHDRREFAKFEKEKMNAK
WDTGENPIYKSAVTTVVNPKYEGK

SEQ ID NO:8: Fuziune CD28.GITR

NKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQ
QLOVYSKTGFNC DGKLGNESVTFYLONLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNG
TIHVKGKHLCPSPLEPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLH
SDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS/QLGLHIWQLRSQCMWPRETQLL
EVPPSTEDARSCQFPEEERGERSAEEKGRLGDLWV

SEQ ID NO:9: Fuziune CD28.IL2Ry

NKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQ
QLOVYSKTGFNC DGKLGNESVTFYLONLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNG
TIHVKGKHLCPSPLEPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLH
SDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS/ERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNE
SAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPLYWAPPCYT
LKPET

SEQ ID NO:10: Fuziune CD28.CD40

NKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQ
QLOVYSKTGFNC DGKLGNESVTFYLONLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNG
TIHVKGKHLCPSPLEPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLH
SDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS/KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFP
DDLPGSNTAAPVQETLHGCQPTQEDGKESRISVOERQ

SEQ ID NO:11: Fuziune CD28.CD150

NKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQ
QLOVYSKTGFNC DGKLGNESVTFYLONLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNG
TIHVKGKHLCPSPLEPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLH
SDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS/RRRGKTNHYQTTVEKKSLTIYAQ
VQKPGPLQKKLDSFPAQDPCTTIYVAATEPVPEQSVQETNSITVYASVTLPE

SEQ ID NO:12: Fuziune CD28.CD2.CD40

NKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQ
QLOVYSKTGFNC DGKLGNESVTFYLONLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNG
TIHVKGKHLCPSPLEPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLH
SDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS/KRKKQRSRRNDEELETRAHRVAT
EERGRKPHQIPASTPQNPATSOHPPPPGHRSQAPSHRPPPGHRVQHQPQKRPPAPS

GTQVHQOKGPPLPRPRVQPKPPHGA AENSLSPSSNKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEIF

PDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ

SEQ ID NO:13: Variantă trunchiată a domeniului extracelular al CD28 (IEV)

NKILV KQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQ

5 QLQVYSKTGFNCDGKLGNESVTFYLNLYVNQTDIYFCKIEV

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- E. LANITIS ET AL: "Chimeric Antigen Receptor T Cells with Dissociated Signaling Domains Exhibit Focused Antitumor Activity with Reduced Potential for Toxicity In Vivo", CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH, vol. 1, no. 1, 7 April 2013 (2013-04-07), pages 43 - 53, XP055170367, ISSN: 2326-6066, DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0008
- WO-A1-2016/141357
- ALVAREZ-VALLINA L ET AL: "ANTIGEN-SPECIFIC TARGETING OF CD28-MEDIATED T CELL CO-STIMULATION USING CHIMERIC SINGLE-CHAIN ANTIBODY VARIABLE FRAGMENT-CD28 RECEPTORS", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILEY VCH, WEINHEIM, vol. 26, no. 10, 1 October 1996 (1996-10-01), pages 2304 - 2309, XP000646504, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/EJI.1830261006
- KEYU LI ET AL: "Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells for Liver Cancers, Progress and Obstacles", TUMOR BIOLOGY, vol. 39, no. 3, 28 March 2017 (2017-03-28), pages 1 - 8, XP055571345, DOI: 10.1177/1010428317692229

(57) Revendicări:

1. Receptor costimulator himeric (CoStAR) cuprinzând (i) un domeniu de legare a antigenului asociat cu o boală sau cu o tumoare; și (ii) un segment de legare a ligandului extracelular al unei prime proteine receptor costimulator, și (iii) un prim segment intracelular cuprinzând un domeniu de semnalizare intracelular al primei proteine receptoare costimulatoare, și (iv) un al doilea segment intracelular cuprinzând un domeniu de semnalizare intracelular al unei a doua proteine receptoare;

în care prima proteină receptor costimulator este CD28; și în care cea de-a doua proteină receptor este CD40,

în care domeniul de legare a antigenului asociat cu o boală sau cu o tumoare este atașat de segmentul de legare a ligandului extracelular al primei proteine receptor costimulator, și

în care domeniul de legare a antigenului asociat cu o boală sau cu o tumoare este un domeniu de legare a antigenului asociat cu un cancer sau cu o tumoare.

2. CoStAR așa cum a fost revendicat în revendicarea 1, în care receptorul costimulator himeric cuprinde SEQ ID NO:10.

3. CoStAR așa cum a fost revendicat în revendicarea 1 sau 2, în care receptorul costimulator himeric menționat include întreaga proteină receptor costimulator CD28 matură lipsită de peptida de semnal și de până la 5 aminoacizi de la capătul N-terminal al proteinei receptor costimulator mature.

4. CoStAR așa cum a fost revendicat în oricare dintre revendicările precedente, în care receptorul costimulator himeric menționat include întreaga proteină receptor costimulator CD28 matură lipsită de peptida de semnal și de 1 sau 2 aminoacizi de la capătul N-terminal al proteinei receptor costimulator mature.

5. CoStAR așa cum a fost revendicat în oricare dintre revendicările precedente, în care segmentul de legare a ligandului extracelular al CD28 cuprinde o trunchiere la aminoacizii IEV cu SEQ ID NO: 2.

6. CoStAR din oricare dintre revendicările precedente, în care domeniul de legare a antigenului este selectat dintre:

I. un fragment de anticorp cu un singur lanț care se leagă la un antigen asociat cu o tumoare incluzând, dar nelimitându-se la, antigenul carcinoembrionar (CEA), 5T4, melanotransferina (CD228), Her2, EGFR, GPC3, proteoglicanul condroitin-sulfat asociat cu melanomul (MCSP/CSPG4), CD71, SM5-1, receptorul folat sau CA125; sau

II. un fragment de anticorp cu un singur lanț care se leagă la un complex de histocompatibilitate major (MHC) – peptidă (p) specific pentru tumoare; sau

III. un receptor al celulei T cu un lanț unic specific unui antigen de complex pMHC specific pentru tumoare (scTCR); sau

IV. o polipeptidă naturală de legare a antigenului cum ar fi, dar nelimitându-se la, transferina; sau

V. un domeniu care se leagă la un anticorp (de ex. domenii de legare a Fc, cum ar fi, dar nelimitându-se la, CD16, CD32 sau CD64).

7. Proteină de fuziune care cuprinde un CoStAR în conformitate cu oricare dintre revendicările precedente, fuzionată cu o proteină marker de genă (de ex. eticheta de epitop DYKDDDDK (SEQ ID NO:14), CD34, CD19 etc.), un receptor al antigenului himeric (CAR), un receptor al celulei T (TCR) sau un alt receptor cu utilizare imunoterapeutică pentru terapia celulară adoptivă care cuprinde opțional o peptidă auto-clivantă între CoStAR și proteina de interes.

8. Secvență de acizi nucleici care codifică o proteină de fuziune cuprinzând SEQ ID NO: 10 sau o variantă a acesteia având cel puțin 80% identitate a secvenței la nivel de proteină, în care proteina de fuziune este un CoStAR.

9. Vector care cuprinde o secvență de acizi nucleici în conformitate cu revendicarea 8, care cuprinde opțional de asemenea o secvență care codifică un receptor al unui antigen himeric, un receptor al unei celule T sau un alt receptor cu utilizare imunoterapeutică pentru terapia celulară adoptivă, astfel încât atunci când vectorul este utilizat pentru a transduce o celulă țintă, celula țintă co-exprimă CoStAR în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-6, și un receptor al unui antigen himeric, un receptor al celulei T sau un alt receptor de interes imunoterapeutic.

10. Celulă care exprimă CoStAR în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-6.

11. Celulă în conformitate cu revendicarea 10, care co-exprimă CoStAR din oricare dintre revendicările 1-6, și un POI la suprafața celulei.

12. Celulă care cuprinde o secvență de acizi nucleici în conformitate cu revendicarea 8.

13. Celulă în conformitate cu oricare dintre revendicările 10-12, care este o celulă T.

14. Metodă de fabricare a unei celule în conformitate cu oricare dintre revendicările 10-13, care cuprinde etapa de transducție sau de transfectare a unei celule cu un vector în conformitate cu revendicarea 9.

15. Metodă de selectare a celulelor care exprimă o POI care cuprinde următoarele etape:

I. detectarea exprimării epitopului POI pe suprafața celulelor transfectate sau transduse cu un vector în conformitate cu revendicarea 9; și

II. selectarea celulelor care sunt identificate ca exprimând epitopul POI.

16. Metodă de preparare a unei populații purificate de celule îmbogățite în celule care exprimă un POI care cuprinde etapa de selectare a celulelor care exprimă un POI dintr-o populație de celule utilizând o metodă în conformitate cu revendicarea 15.

17. Metodă în conformitate cu revendicarea 16, care cuprinde transducția sau transfecția ex vivo a unei populații de celule izolate dintr-un donor de țesut sau celulă cu:

un vector în conformitate cu revendicarea 9; și

selectarea celulelor care exprimă POI din populația de celule transdusă/transfectată printr-o metodă în conformitate cu revendicarea 15.

18. Celula din revendicarea 10, pentru utilizare ca medicament.

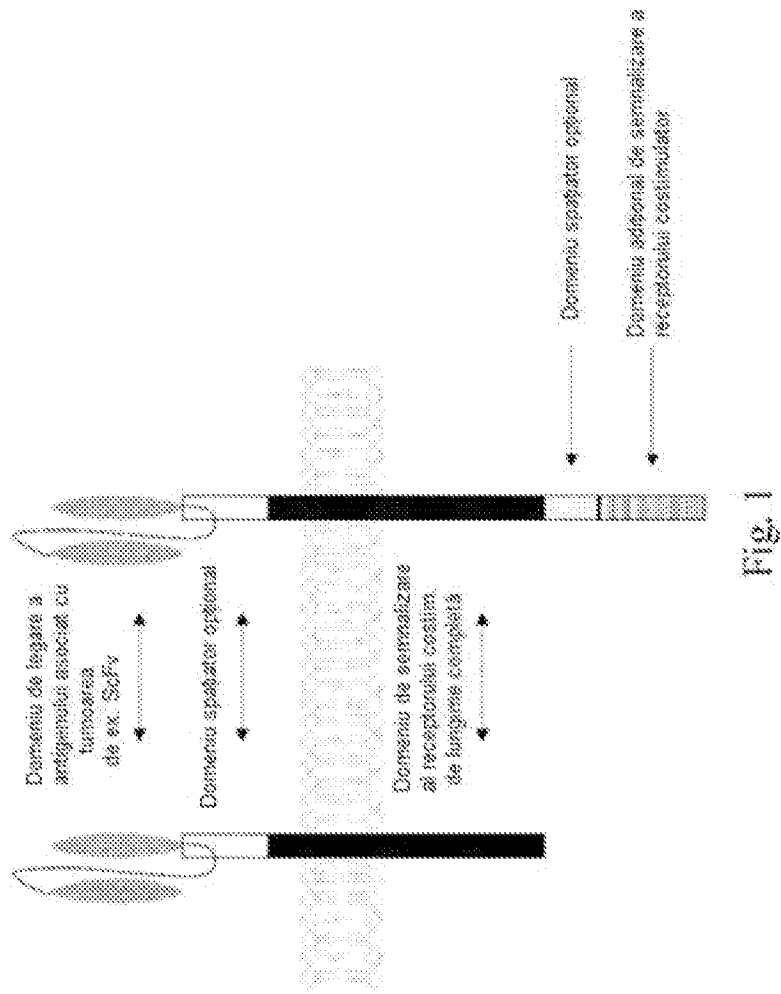
19. Celula din revendicarea 10, pentru utilizare în tratarea cancerului și/sau în transferul celular adoptiv.

20. CoStAR din revendicarea 6, cuprinzând suplimentar:

(i) un domeniu de semnalizare cuprinzând sau constând din o CD28 umană de lungime completă cu SEQ ID NO:2 sau o variantă a acesteia având cel puțin 80% identitate a secvenței la nivel de secvență în care menționata CD28 umană de lungime completă nu cuprinde peptida de semnal și opțional nu are până la 5 aminoacizi de la capătul N terminal al proteinei receptor mature odată ce peptida de semnal a acesteia a fost clivată; și

(ii) domeniul intracelular de la CD40 umană așa cum a fost arătat în SEQ ID NO: 10 sau o variantă a acestuia având cel puțin 80% sau 90% identitate a secvenței la nivel de secvență, în care domeniul intracelular de la CD40 umană sau o variantă a acesteia are activitate funcțională ca domeniu de semnalizare intracelulară a CD40.

21. CoStAR din revendicarea 6, în care receptorul folatului este receptorul alfa al folatului.



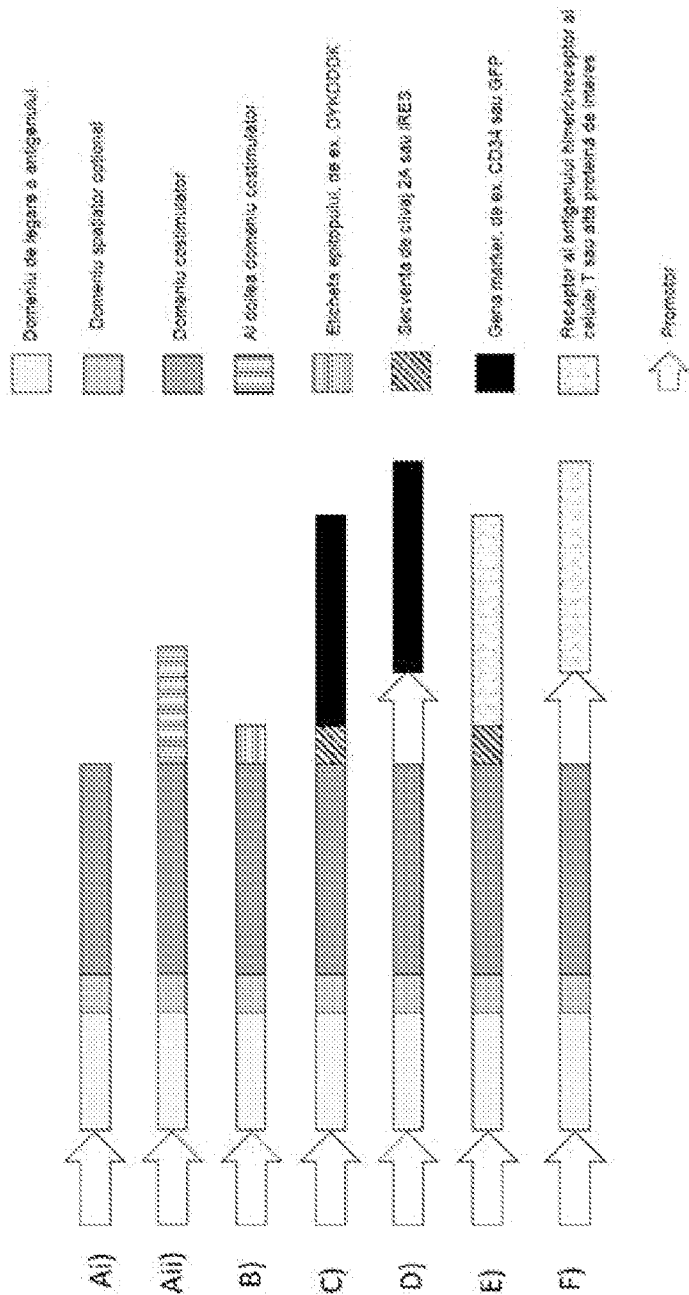


Fig. 2

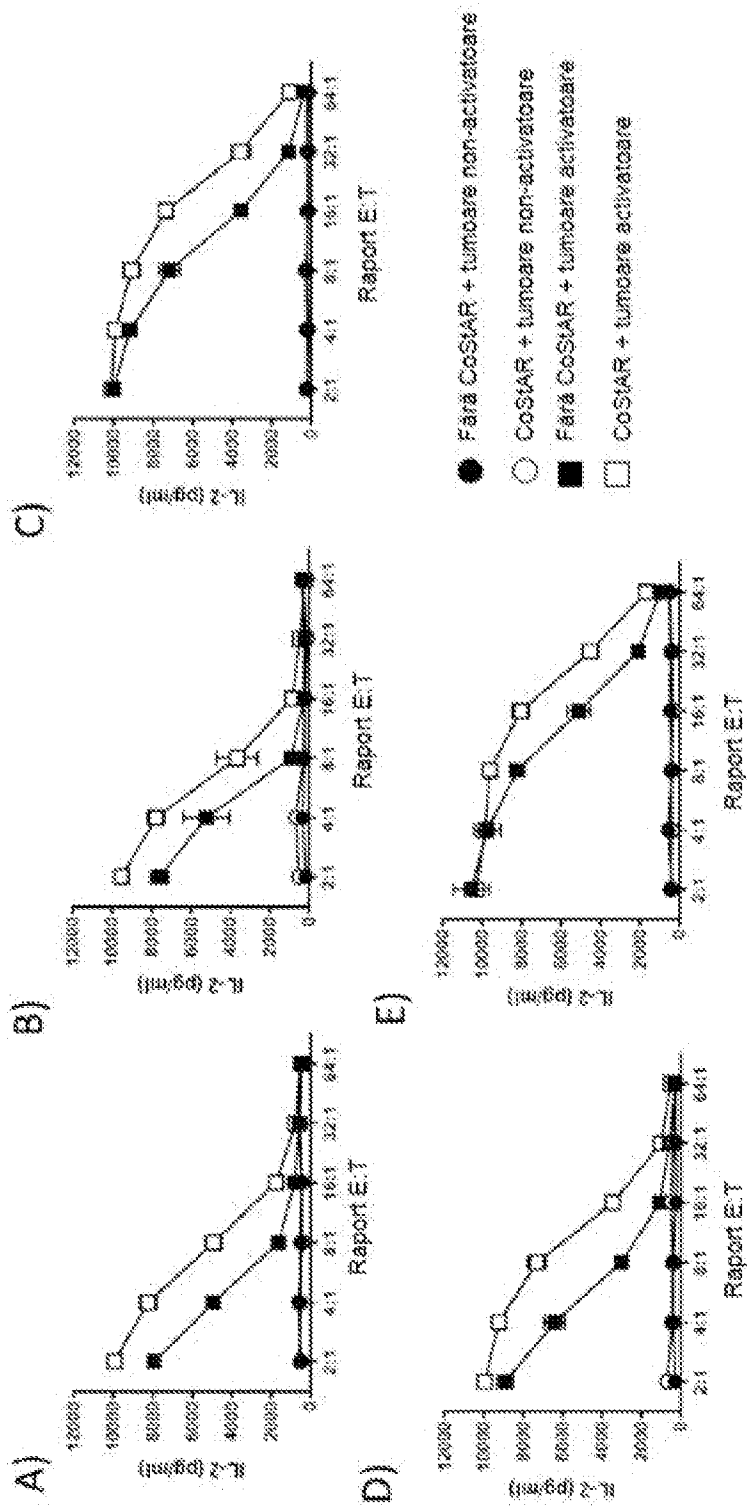


Fig. 3

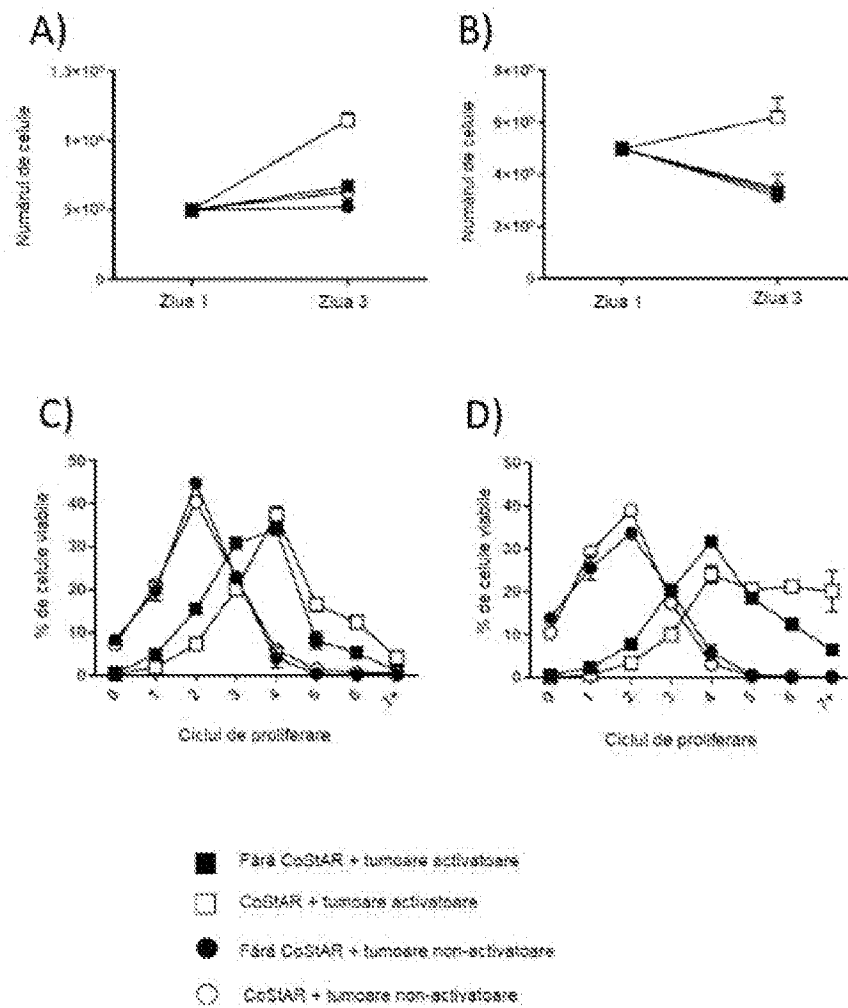


Fig. 4

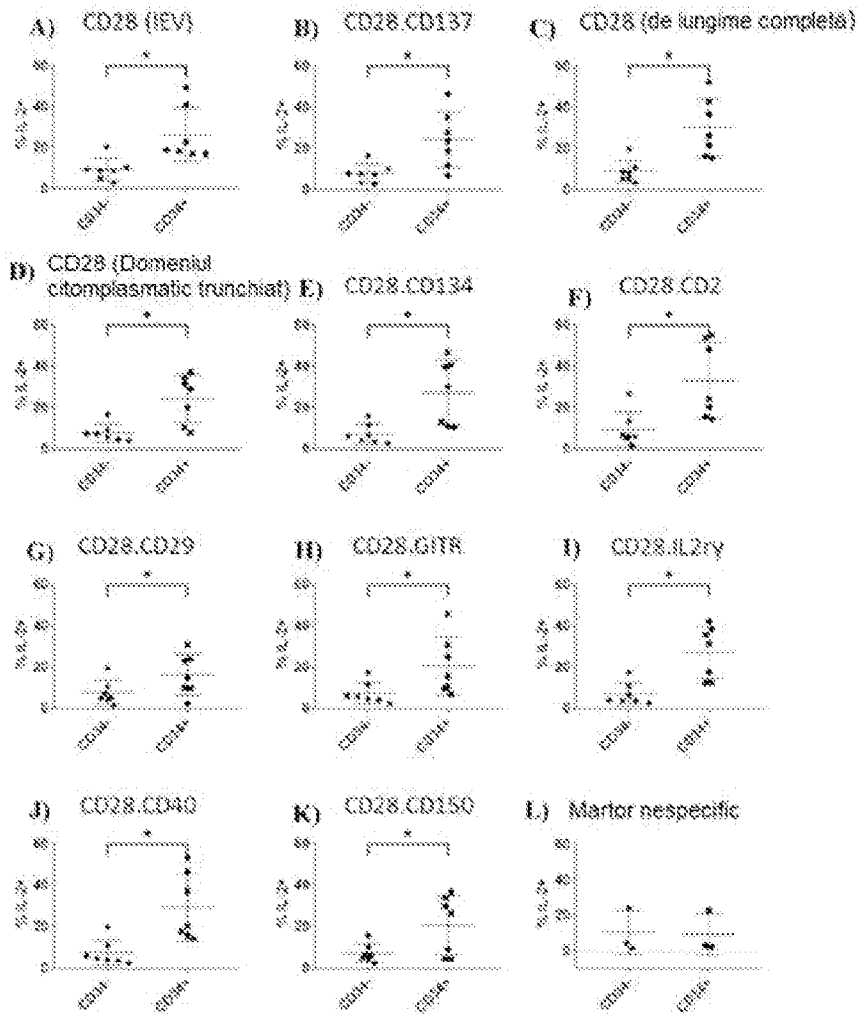


Fig. 5

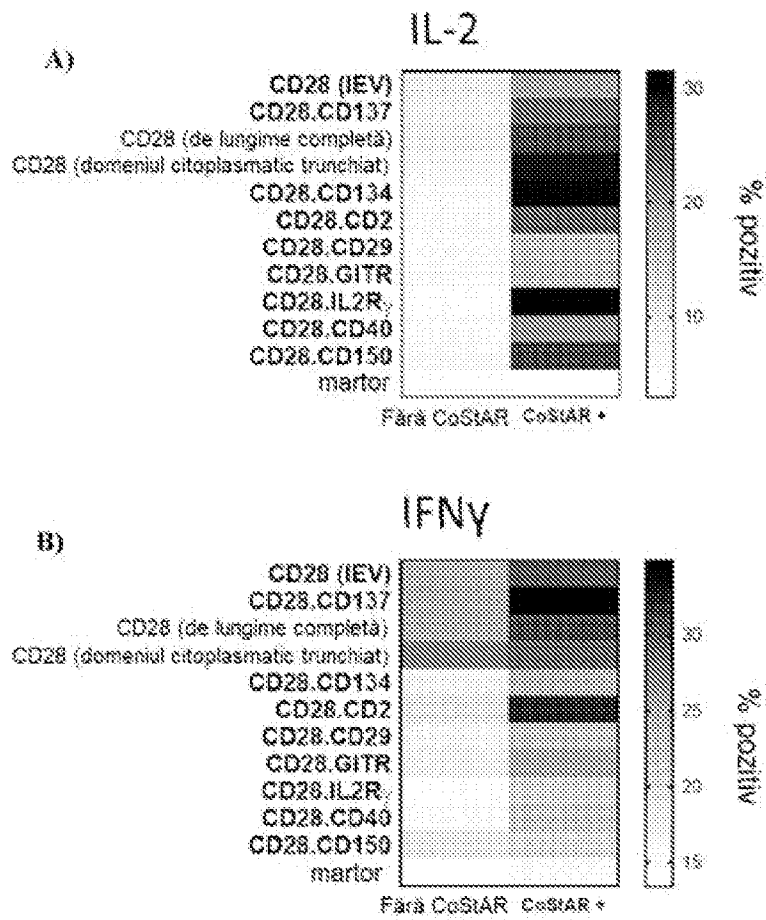


Fig. 6A-6B

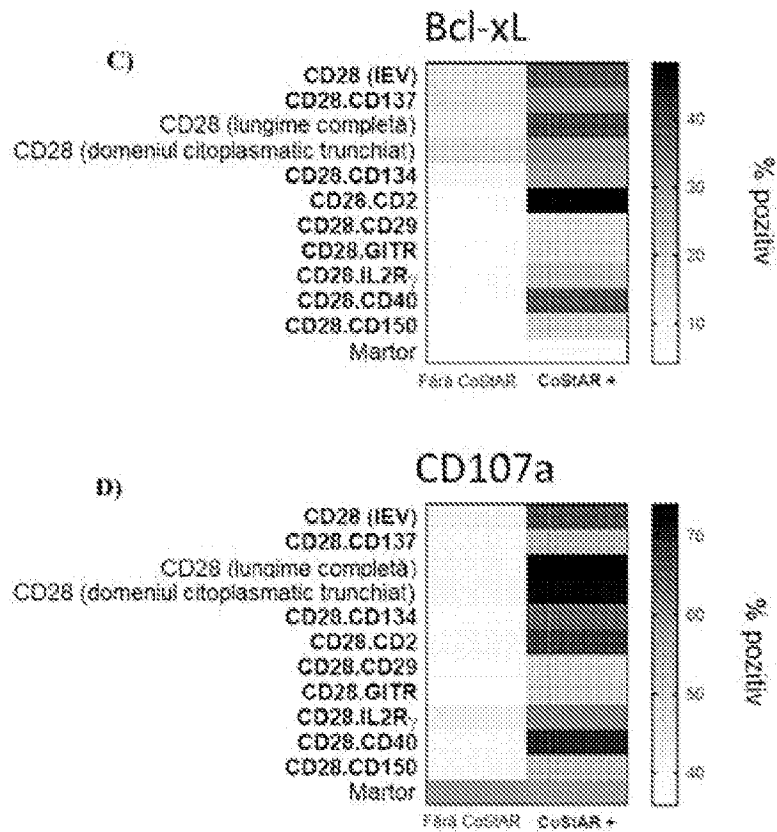


Fig. 6C-6D

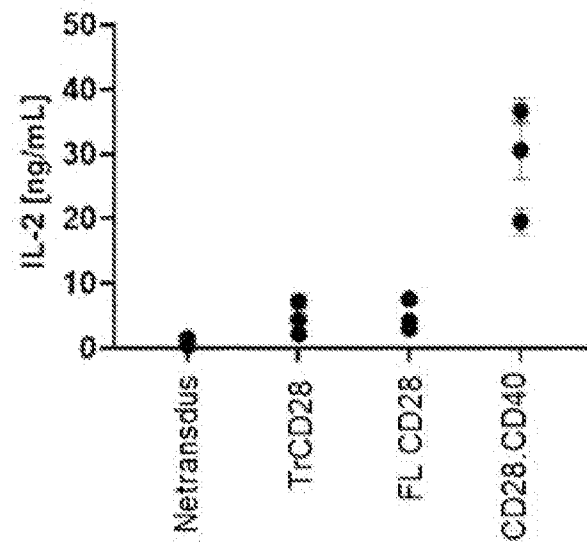


Fig. 7

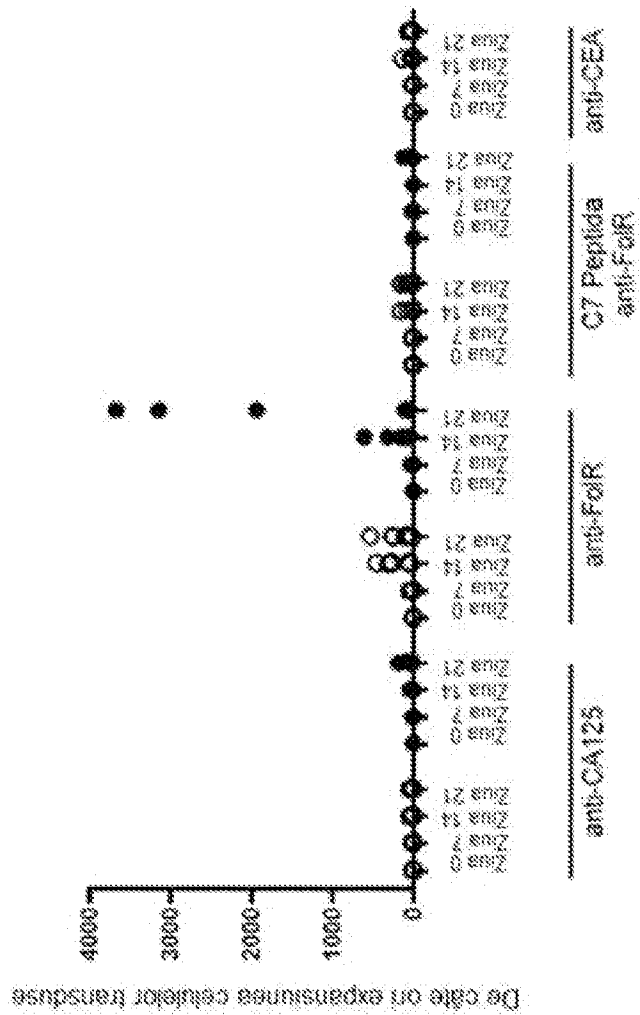


Fig. 8

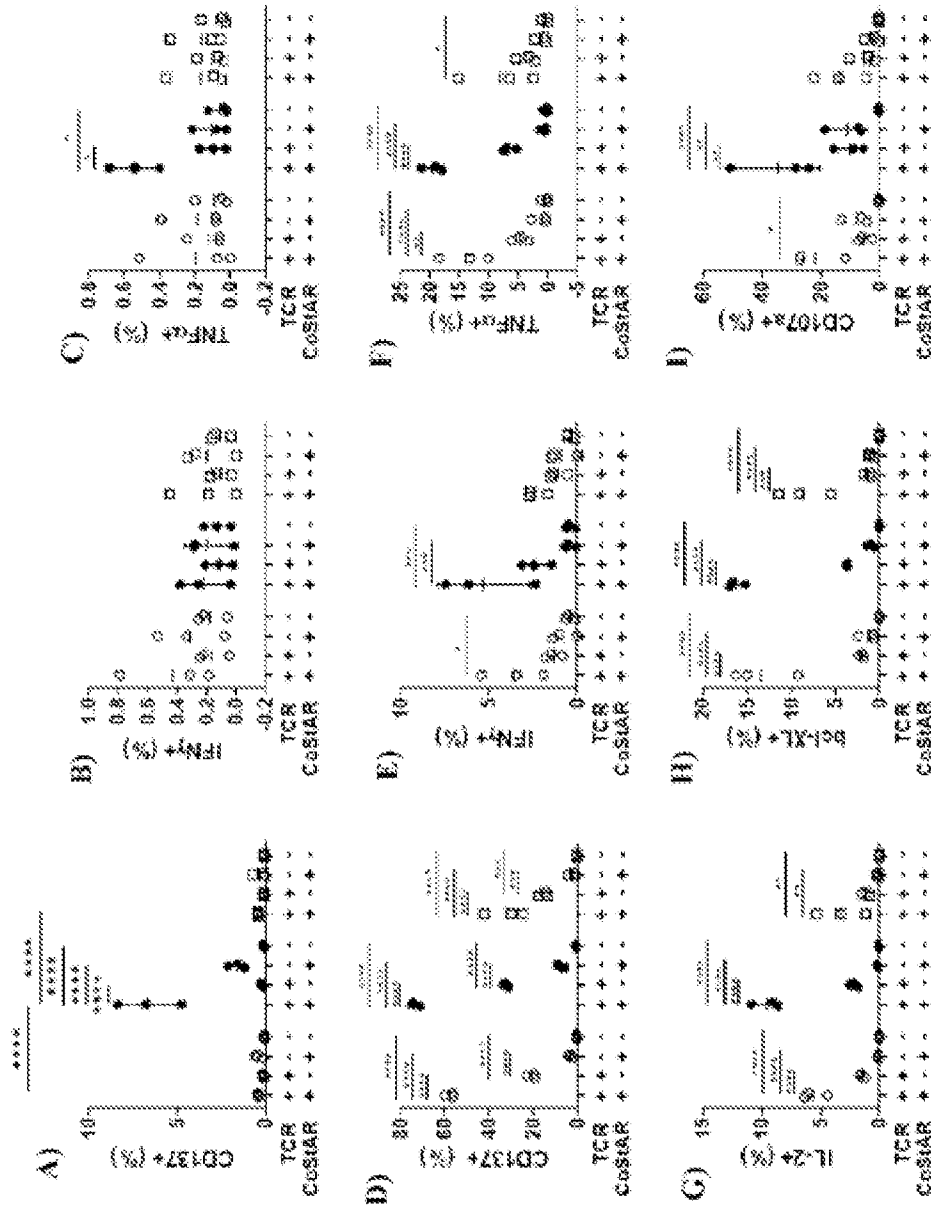


Fig. 9

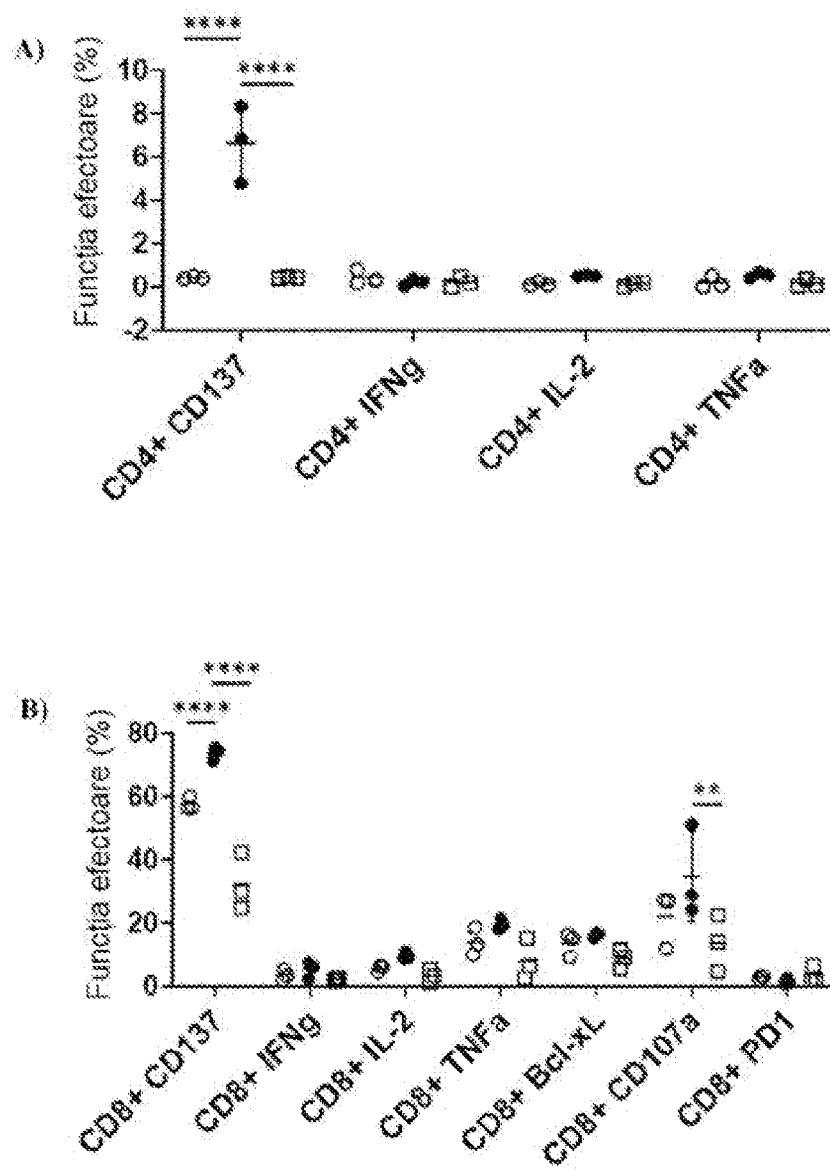


Fig. 10