

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 415**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/44 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.06.2019 PCT/US2019/037270**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2019 WO19241685**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2019 E 19819809 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2024 EP 3806903**

54 Título: **Receptores de antígenos quiméricos contra CD79A**

30 Prioridad:
14.06.2018 US 201862685078 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.08.2024

73 Titular/es:
REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:
FRIEDMAN, KEVIN y
PERKINS, MOLLY REED

74 Agente/Representante:
FERNÁNDEZ POU, Felipe

Observaciones:

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

ES 2 977 415 T3

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

DESCRIPCIÓN

Receptores de antígenos quiméricos contra CD79A

5 Declaración con respecto al listado de secuencias

El Listado de secuencias asociado con esta solicitud se proporciona en formato de texto en lugar de una copia en papel. El nombre del archivo de texto que contiene el Listado de secuencias es BLBD_100_01WO_ST25.txt. El archivo de texto es de 64 KB, creado el 14 de junio de 2019, y se envía electrónicamente mediante EFS-Web, simultáneamente con la presentación de la descripción.

Antecedentes

15 Campo técnico

La presente invención se refiere a composiciones y métodos mejorados para tratar el cáncer. Más particularmente, la invención se refiere a receptores de antígenos quiméricos (CAR) anti-CD79A mejorados, células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente, y el uso de estas composiciones para tratar efectivamente los cánceres que expresan CD79A.

20 Descripción de la técnica relacionada

El cáncer es un problema de salud significativo en todo el mundo. Basado en las tasas de 2008-2010, el 40,76 % de los hombres y mujeres nacidos hoy se diagnosticarán con algún tipo de cáncer en algún momento de su vida. El 20,37 % de los hombres desarrollarán cáncer entre sus 50 y 70 años, en comparación con el 15,30 % de las mujeres. El 1 de enero de 2010, en los Estados Unidos había aproximadamente 13 027 914 de hombres y mujeres vivos que tenían antecedentes de cáncer: 6 078 974 hombres y 6 948 940 mujeres. Se estima que se diagnosticarán con cáncer 1 660 290 hombres y mujeres (854 790 hombres y 805 500 mujeres) en los Estados Unidos, y 580 350 hombres y mujeres morirán de cáncer en todos los sitios en 2013. Howlader y otros, 2013.

La transformación maligna de las células B conduce a cánceres, lo que incluye los linfomas, por ejemplo, mieloma múltiple y linfoma no Hodgkin. La gran mayoría de los pacientes con neoplasias malignas de células B, lo que incluye el linfoma no Hodgkin (NHL) y el mieloma múltiple (MM), contribuyen de forma significativa a la mortalidad por cáncer. La respuesta de las neoplasias malignas de células B a diversas formas de tratamiento es mixta. Los métodos tradicionales para tratar las neoplasias malignas de células B, lo que incluye la quimioterapia y la radioterapia, tienen una utilidad limitada debido a efectos secundarios tóxicos. La inmunoterapia con anticuerpos terapéuticos anti-CD19, anti-CD20, anti-CD22, anti-CD23, anti-CD52, anti-CD80 y anti-HLA-DR ha proporcionado un éxito limitado, debido en parte a perfiles farmacocinéticos deficientes, la eliminación rápida de los anticuerpos por las proteasas séricas y la filtración en el glomérulo, y la penetración limitada en el sitio tumoral y los niveles de expresión del antígeno objetivo en las células cancerosas. Los intentos de usar células modificadas genéticamente que expresan receptores de antígenos quiméricos (CAR) también se han encontrado con un éxito limitado. Además, la eficacia terapéutica de un dominio de unión a antígeno dado usado en un CAR en particular puede ser impredecible: si el dominio de unión a antígeno se une demasiado fuertemente, las células T-CAR pueden inducir una liberación masiva de citocinas, lo que da como resultado una reacción inmunitaria potencialmente mortal considerada una "tormenta de citocinas", y si el dominio de unión a antígeno se une demasiado débilmente, las células T-CAR pueden no mostrar suficiente eficacia terapéutica en la eliminación de las células cancerosas.

El documento WO2015/164759 A1 describe CAR anti-CD79A y su uso en el tratamiento del cáncer.

50 T.J. Fry y otros, "T-cell adoptive immunotherapy for acute lymphoblastic leukemia" American Society of Hematology; vol. 2013; núm. 1; diciembre de 2013, describe CAR anti-CD79A para su uso contra la leucemia linfocítica aguda.

El documento WO 2017/009474 A1 describe anticuerpos anti-CD79A y su uso en CAR.

55 El documento WO 2013/049254 A1 describe el Ab anti-CD79A 9G6.

El documento WO 2016/112870 A1 describe el Ab anti-CD79A 24C10.

60 S V Kulemzin y otros, "Engineering Chimeric Antigen Receptors" Acta Naturea; páginas 6-14; enero de 2017, revisa las cuestiones estructurales con respecto a la capacidad de un scFv dado para formar una sinapsis inmunitaria-CAR óptimamente funcional.

Breve resumen

65 La invención se define mediante las reivindicaciones.

Cualquier aspecto, modalidad y ejemplo de la presente descripción que no caiga dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención y se proporciona simplemente para ilustración.

5 La invención proporciona generalmente vectores mejorados para generar terapias celulares adoptivas y métodos para usar los mismos. Más particularmente, la invención proporciona moléculas CAR anti-CD79A y su uso en el tratamiento de los cánceres que expresan CD79A.

10 La invención proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende: a) un dominio extracelular que comprende un anticuerpo anti-CD79A o un fragmento de unión a antígeno de este que se une a uno o más epítomos de un polipéptido CD79A humano, en donde el anticuerpo anti-CD79A o fragmento de unión a antígeno de este comprende una o más CDR de la cadena ligera como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-3 y una o más CDR de la cadena pesada como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 4-6; o una o más CDR de la cadena ligera como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 9-11 y una o más CDR de la cadena pesada como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 12-14; o una o más CDR de la cadena ligera como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 17-19 y una o más CDR de la cadena pesada como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 20-22; b) un dominio transmembrana; c) uno o más dominios de señalización coestimuladores intracelulares; y d) un dominio de señalización primario.

20 En modalidades particulares, el anticuerpo anti-CD79A o fragmento de unión a antígeno que se une al polipéptido CD79A humano se selecciona del grupo que consiste en: un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un dímero Fab biespecífico (Fab₂), un trímero Fab trispecífico (Fab₃), un Fv, una proteína Fv de cadena única ("scFv"), un bis-scFv, (scFv)₂, un minicuerpo, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, una proteína Fv estabilizada con disulfuro ("dsFv").

25 En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-CD79A o fragmento de unión a antígeno que se une al polipéptido CD79A humano es un scFv.

30 En modalidades particulares, el anticuerpo anti-CD79A o fragmento de unión a antígeno de este comprende una o más CDR de la cadena ligera como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-3 y/o una o más CDR de la cadena pesada como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 4-6.

35 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79A o fragmento de unión a antígeno de este comprende una o más CDR de la cadena ligera como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 9-11 y/o una o más CDR de la cadena pesada como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 12-14.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79A o fragmento de unión a antígeno de este comprende una o más CDR de la cadena ligera como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 17-19 y/o una o más CDR de la cadena pesada como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 20-22.

40 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79A o fragmento de unión a antígeno de este comprende una secuencia de la cadena ligera variable como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 15 o 23 y/o una secuencia de la cadena pesada variable como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 8, 16 o 24.

45 En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-CD79A o fragmento de unión a antígeno de este comprende una secuencia de la cadena ligera variable con al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 15 o 23 y/o una secuencia de la cadena pesada variable con al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 8, 16 o 24.

50 En modalidades adicionales, el anticuerpo anti-CD79A o fragmento de unión a antígeno de este comprende una secuencia de la cadena ligera variable como se expone en la SEQ ID NO: 7 y/o una secuencia de la cadena pesada variable como se expone en la SEQ ID NO: 8.

55 En modalidades adicionales, el anticuerpo anti-CD79A o fragmento de unión a antígeno de este comprende una secuencia de la cadena ligera variable como se expone en la SEQ ID NO: 15 y/o una secuencia de la cadena pesada variable como se expone en la SEQ ID NO: 16.

60 En modalidades adicionales, el anticuerpo anti-CD79A o fragmento de unión a antígeno de este comprende una secuencia de la cadena ligera variable como se expone en la SEQ ID NO: 23 y/o una secuencia de la cadena pesada variable como se expone en la SEQ ID NO: 24.

65 En modalidades adicionales, el dominio transmembrana es de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: cadena alfa o beta del receptor de células T, CDδ, CD3ε, CDγ, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD154 y PD1.

ES 2 977 415 T3

- En modalidades adicionales, el dominio transmembrana es de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: CD8 α , CD28, CD4, CD45, PD1 y CD152.
- 5 En algunas modalidades, el dominio transmembrana es de CD8 α .
- En modalidades adicionales, el uno o más dominios de señalización coestimuladores son de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM y ZAP70.
- 10 En ciertas modalidades, el uno o más dominios de señalización coestimuladores son de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CD28, CD134 y CD137.
- En algunas modalidades, el uno o más dominios de señalización coestimuladores son de CD137.
- 15 En modalidades particulares, el dominio de señalización primario se aísla de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b y CD66d.
- En modalidades particulares, el dominio de señalización primario se aísla de CD3 ζ .
- 20 En modalidades adicionales, el CAR comprende además un polipéptido de la región bisagra.
- En ciertas modalidades, el polipéptido de la región bisagra comprende una región bisagra de CD8 α .
- 25 En modalidades adicionales, el CAR comprende además una región espaciadora.
- En modalidades adicionales, el CAR comprende además un péptido señal.
- En modalidades particulares, el péptido señal comprende un polipéptido señal de la cadena pesada de IgG1, un polipéptido señal CD8 α o un polipéptido señal del receptor alfa de GM-CSF humano.
- 30 En modalidades particulares, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 25 a 30.
- 35 En modalidades particulares, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 25.
- En modalidades particulares, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 26.
- 40 En modalidades particulares, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 27.
- En modalidades particulares, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 28.
- En modalidades particulares, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 29.
- 45 En modalidades particulares, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 30.
- En diversas modalidades, se proporciona un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del CAR contemplado en la presente descripción.
- 50 En diversas modalidades, se proporciona un polinucleótido que codifica un CAR contemplado en la presente descripción.
- En modalidades particulares, un polinucleótido que codifica un CAR contemplado en la presente descripción comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 31-36.
- 55 En diversas modalidades, se proporciona un vector que comprende un polinucleótido que codifica un CAR contemplado en la presente descripción.
- En ciertas modalidades, el vector es un vector de expresión.
- 60 En modalidades particulares, el vector es un vector episomal.
- En modalidades adicionales, el vector es un vector viral.
- 65 En modalidades adicionales, el vector es un vector retroviral.

En modalidades particulares, el vector es un vector lentiviral.

5 En modalidades adicionales, el vector lentiviral se selecciona del grupo que consiste esencialmente de: virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1); virus de la inmunodeficiencia humana 2 (VIH-2), virus de visna-maedi (VMV); virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV); virus de la anemia infecciosa equina (EIAV); virus de la inmunodeficiencia felina (FIV); virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV); y virus de la inmunodeficiencia en simios (SIV).

10 En modalidades particulares, el vector comprende una LTR retroviral izquierda (5'), una señal de empaque Psi (Ψ), un tracto de polipurina central/solapa de ADN (cPPT/FLAP), un elemento de exportación retroviral; un promotor unido operativamente al polinucleótido; y una LTR retroviral derecha (3').

En modalidades adicionales, el vector comprende además una secuencia de poliadenilación heteróloga.

15 En modalidades particulares, el vector comprende además un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis B (HPRE) o un elemento regulador postranscripcional de marmota (WPRE).

En modalidades adicionales, el promotor de la LTR 5' se reemplaza con un promotor heterólogo.

20 En modalidades adicionales, el promotor heterólogo es un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV) o un promotor del virus simio 40 (SV40).

En algunas modalidades, la LTR 5' o la LTR 3' es una LTR de lentivirus.

25 En ciertas modalidades, la LTR 3' comprende una o más modificaciones.

En ciertas modalidades, la LTR 3' comprende una o más deleciones.

En modalidades particulares, la LTR 3' es una LTR autoinactivable (SIN).

30 En modalidades particulares, la secuencia de poliadenilación es una secuencia de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina o una secuencia señal de poliadenilación de la β -globina de conejo.

En modalidades adicionales, el polinucleótido comprende una secuencia de Kozak optimizada.

35 En modalidades adicionales, el promotor unido operativamente al polinucleótido se selecciona del grupo que consiste en: un promotor del gen temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), un promotor del factor de elongación 1 alfa (EF1- α), un promotor de fosfoglicerato quinasa-1 (PGK), un promotor de ubiquitina-C (UBQ-C), un potenciador de citomegalovirus/promotor de beta-actina de pollo (CAG), un potenciador de polioma/promotor de timidina quinasa del herpes simple (MC1), un promotor de beta actina (β -ACT), un promotor del virus simio 40 (SV40), y un promotor del
40 potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo, con región de control negativo eliminada, con sitio de unión al cebador dl587rev sustituido (MND).

45 En diversas modalidades, se proporciona una célula efectora inmunitaria que comprende un vector que codifica un CAR contemplado en la presente descripción.

En modalidades particulares, la célula efectora inmunitaria se selecciona del grupo que consiste en: un linfocito T, una célula asesina natural (NK), y una célula NKT.

50 En algunas modalidades, la célula efectora inmunitaria se transduce con un vector contemplado en la presente descripción y se activa y estimula en presencia de un inhibidor de la vía PI3K, manteniendo de esta manera la proliferación de las células efectoras inmunitarias transducidas, en comparación con la proliferación de células efectoras inmunitarias transducidas que se activaron y estimularon en ausencia del inhibidor de la vía PI3K.

55 En modalidades particulares, la célula efectora inmunitaria activada y estimulada en presencia del inhibidor de la vía PI3K tiene una mayor expresión de i) uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en: CD62L, CD127, CD197 y CD38 o ii) todos los marcadores CD62L, CD127, CD197 y CD38, en comparación con una célula efectora inmunitaria activada y estimulada en ausencia del inhibidor de la vía PI3K.

60 En modalidades particulares, la célula efectora inmunitaria activada y estimulada en presencia del inhibidor de la vía PI3K tiene una mayor expresión de i) uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en: CD62L, CD127, CD27 y CD8 o ii) todos los marcadores CD62L, CD127, CD27 y CD8, en comparación con una célula efectora inmunitaria activada y estimulada en ausencia del inhibidor de la vía PI3K.

65 En una modalidad, el inhibidor de PI3K es ZSTK474.

En diversas modalidades, se proporciona una composición que comprende la célula efectora inmunitaria contemplada

en la presente descripción y un excipiente fisiológicamente aceptable.

Se proporciona un método para generar una población de células efectoras inmunitarias que comprenden un CAR contemplado en la presente descripción, que comprende introducir en una población de células efectoras inmunitarias un vector que codifica un CAR contemplado en la presente descripción.

El método comprende además estimular a las células efectoras inmunitarias e inducir a las células a proliferar al poner en contacto las células con anticuerpos que se unen a CD3 y con anticuerpos que se unen a CD28; generando de esta manera una población expandida de células efectoras inmunitarias.

En ciertas modalidades, las células efectoras inmunitarias se estimulan e inducen a proliferar antes de introducir el vector.

En modalidades adicionales, la población de células efectoras inmunitarias comprende células T.

En algunas modalidades, la población de células efectoras inmunitarias comprende células NK.

En modalidades particulares, las células se activan y estimulan en presencia de un inhibidor de la vía PI3K, manteniendo de esta manera la proliferación de las células efectoras inmunitarias transducidas, en comparación con la proliferación de células efectoras inmunitarias que se activan y estimulan en ausencia del inhibidor de la vía PI3K.

En algunas modalidades, las células efectoras inmunitarias activadas y estimuladas en presencia del inhibidor de la vía PI3K tienen una mayor expresión de i) uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en: CD62L, CD127, CD197 y CD38 o ii) todos los marcadores CD62L, CD127, CD197 y CD38, en comparación con las células efectoras inmunitarias activadas y estimuladas en ausencia del inhibidor de la vía PI3K.

En modalidades particulares, la célula efectora inmunitaria activada y estimulada en presencia del inhibidor de la vía PI3K tiene una mayor expresión de i) uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en: CD62L, CD127, CD27 y CD8 o ii) todos los marcadores CD62L, CD127, CD27 y CD8, en comparación con una célula efectora inmunitaria activada y estimulada en ausencia del inhibidor de la vía PI3K.

En una modalidad, el inhibidor de PI3K es ZSTK474.

Se proporciona un método para aumentar la citotoxicidad en células cancerosas que expresan CD79A en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad de una composición contemplada en la presente descripción suficiente para aumentar la citotoxicidad en células cancerosas que expresan CD79A, en comparación con la citotoxicidad en las células cancerosas que expresan CD79A antes de la administración.

Se proporciona un método para disminuir el número de células cancerosas que expresan CD79A en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad de una composición contemplada en la presente descripción suficiente para disminuir el número de células cancerosas que expresan CD79A, en comparación con el número de células cancerosas que expresan CD79A antes de la administración.

En diversas modalidades, se proporciona un método para tratar un cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición contemplada en la presente descripción.

En ciertas modalidades, el cáncer es un cáncer linfoide.

En algunas modalidades, el cáncer es una neoplasia maligna hematológica.

En modalidades adicionales, el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer suprarrenal, melanoma, cáncer de útero, cáncer testicular o cáncer de vejiga, linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas (HCL), mieloma múltiple (MM), leucemia mieloide aguda (AML) o leucemia mieloide crónica (CML).

En modalidades particulares, el linfoma no Hodgkin es linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular (FL), linfoma de células del manto (MCL) o linfoma de zona marginal (MZL).

En ciertas modalidades, el cáncer es leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas (HCL), mieloma múltiple (MM), leucemia mieloide aguda (AML) o leucemia mieloide crónica (CML).

En modalidades particulares, el cáncer es linfoma difuso de células B grandes (DLBCL).

En modalidades particulares, el cáncer es un MM seleccionado del grupo que consiste en: mieloma múltiple evidente, mieloma múltiple indolente, leucemia de células plasmáticas, mieloma no secretor, mieloma IgD, mieloma

osteoesclerótico, plasmocitoma solitario de hueso y plasmocitoma extramedular

Se proporciona un método para mejorar uno o más síntomas asociados con un cáncer que expresa CD79A en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad de una composición contemplada en la presente descripción suficiente para mejorar al menos un síntoma asociado con las células cancerosas que expresan CD79A.

El uno o más síntomas mejorados se seleccionan del grupo que consiste en: debilidad, fatiga, falta de aliento, tendencia a desarrollar hematomas y hemorragias, infecciones frecuentes, ganglios linfáticos agrandados, abdomen distendido o doloroso, dolor óseo o articular, fracturas, pérdida de peso no planificada, inapetencia, sudoraciones nocturnas, fiebre leve persistente y disminución de la micción.

Breve descripción de varias vistas de los dibujos

La Figura 1 muestra la expresión de CD79A en células objetivo, la expresión de CAR y la actividad dependiente del antígeno de células T-CAR anti-CD79A en presencia de células objetivo que expresan CD79A. A) Este panel muestra la expresión de CD79A en células Pfeiffer y Daudi, pero no en células K562. B) Este panel muestra la expresión representativa de CAR anti-CD79A en células T medida mediante el uso de citometría de flujo. C) Este panel muestra la secreción de IFN γ de células T-CAR anti-CD79A cultivadas conjuntamente en ausencia de células objetivo o con células K562 (CD79A-), células Daudi (CD79A+, expresión alta) o células Pfeiffer (CD79A+, expresión baja).

La Figura 2 muestra la expresión de CAR, la expresión de CD79A en las células objetivo y la actividad dependiente de antígeno de células T-CAR anti-CD79A en presencia de células objetivo que expresan CD79A. A) Este panel muestra la densidad del receptor de CD79A en células Daudi, NU-DUL-1, SU-DHL-2 y Pfeiffer. B) Este panel muestra la expresión representativa de CAR anti-CD79A en células T medida mediante el uso de citometría de flujo. C) Este panel muestra la secreción de IFN γ de células T-CAR anti-CD79A cultivadas conjuntamente en ausencia de células objetivo o con células Huh7 (CD79A-), células Huh7.CD79a (CD79A+), células Daudi (CD79A+), NU-DUL-1 (CD79A+), SU-DHL-2 (CD79A+) o células Pfeiffer (CD79A+).

Breve descripción de los identificadores de secuencias

Las SEQ ID NO: 1-24 exponen secuencias de aminoácidos de secuencias de CDR de la cadena ligera ilustrativas, secuencias de CDR de la cadena pesada, cadenas ligeras de dominio variable y cadenas pesadas de dominio variable para los CAR anti-CD79A contemplados en la presente descripción.

Las SEQ ID NO: 25-30 exponen las secuencias de aminoácidos de CAR anti-CD79A ilustrativos.

Las SEQ ID NO: 31-36 exponen las secuencias de ácido nucleico de CAR anti-CD79A ilustrativos.

Las SEQ ID NO: 37-38 exponen las secuencias de aminoácidos de polipéptidos CD79A humanos ilustrativos.

Las SEQ ID NO: 39-49 exponen las secuencias de aminoácidos de diversos enlazadores.

Las SEQ ID NO: 50-74 exponen las secuencias de aminoácidos de los sitios de escisión por proteasas y los sitios de escisión de polipéptidos autoescindibles.

Descripción detallada

A. Descripción general

La invención se refiere generalmente a composiciones y métodos mejorados para prevenir o tratar cánceres que expresan CD79A o para prevenir, tratar o mejorar al menos un síntoma asociado con un cáncer que expresa CD79A. En modalidades particulares, la invención se refiere a una terapia celular adoptiva mejorada de cánceres que expresan CD79A, mediante el uso de células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente. Los enfoques genéticos ofrecen un posible medio para potenciar el reconocimiento inmunitario y la eliminación de células cancerosas. Una estrategia prometedora es manipular genéticamente las células efectoras inmunitarias para expresar receptores de antígenos quiméricos (CAR) que redirijan la citotoxicidad hacia las células cancerosas.

Las composiciones y métodos mejorados de terapia celular adoptiva contemplados en la presente descripción, proporcionan células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente que pueden expandirse fácilmente, exhiben persistencia a largo plazo in vivo y demuestran citotoxicidad dependiente del antígeno a células que expresan CD79A, también conocida como cadena alfa de la proteína asociada al complejo del receptor del antígeno de células B, proteína asociada a inmunoglobulina unida a la membrana (MB1, MB-1), proteína asociada a IgM de superficie, e Ig-alfa (IGA). Ejemplos ilustrativos de secuencias de polinucleótidos que codifican CD79a incluyen: NM_001783.3, NM_021601.3, ENST00000221972 (uc002orv.3), ENST00000597454 (uc060zdz.1), ENST00000444740 (uc002oru.4), Hs.631567 y AK223371. Ejemplos ilustrativos de secuencias polipeptídicas que codifican CD79a incluyen: P11912-1, P11912-2, ENSP00000400605 ENSP00000468922, ENSP00000221972, NP_001774.1 y NP_067612.1.

El CD79 consiste en dos proteínas, específicamente, CD79A y CD79B. CD79A se ubica en el cromosoma 19q13.2 y codifica una glicoproteína de 226 aminoácidos de aproximadamente 47 kDa. El peso molecular exacto depende de la extensión de la glicosilación. CD79B se ubica en el cromosoma 17q23 y codifica una glicoproteína de 229 aminoácidos de aproximadamente 37 kDa. CD79A y CD79B comparten una estructura exón-intrón, ambas contienen un único dominio Ig de IgSF (tipo C de 111 residuos para CD79A y tipo V de 129 residuos para CD79B). Cada una contiene además un dominio transmembrana altamente conservado y una cola citoplasmática de 61 (CD79A) o 48 (CD79B) aminoácidos que también exhibe una marcada conservación evolutiva de los aminoácidos. CD79A y CD79B se expresan por las progenitoras de células B comprometidas más tempranas. El heterodímero CD79A/B también se ha observado en la superficie de progenitoras de células B tempranas en ausencia de la cadena pesada μ , aunque no se requiere ninguna proteína para que las progenitoras se comprometan con el linaje de células B. Más tarde en el desarrollo, CD79A y CD79B se coexpresan junto con Ig de todos los isotipos en la superficie de las células B como un complejo BCR maduro. Las proteínas CD79 son específicas del linaje B y se expresan a lo largo de la linfopoyesis B. CD79A y CD79B pueden usarse como marcadores para la identificación de neoplasias de células B, lo que incluye el DLBCL, la mayoría de las leucemias agudas del tipo de células B precursoras, en líneas de células B, linfomas de células B y en algunos mielomas.

En diversas modalidades, los CAR que comprenden secuencias de anticuerpos anti-CD79A son altamente eficaces; experimentan una expansión *in vivo* robusta; y reconocen células cancerosas que expresan CD79A y muestran actividad citotóxica contra las células cancerosas que expresan CD79A.

En una modalidad, se proporciona un CAR que comprende un anticuerpo anti-CD79A o un fragmento de unión a antígeno, un dominio transmembrana y uno o más dominios de señalización intracelular.

En una modalidad, se modifica genéticamente una célula efectora inmunitaria para expresar un CAR. Las células T que expresan un CAR se denominan en la presente descripción células T-CAR o células T modificadas con CAR.

En diversas modalidades, las células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente se administran a un sujeto con células cancerosas que expresan CD79A, lo que incluye tumores líquidos y neoplasias hematológicas. En una modalidad, las células T-CAR anti-CD79A se administran a un sujeto que tiene DLBCL.

Las técnicas para ADN recombinante (es decir, manipulado), síntesis de péptidos y oligonucleótidos, inmunoensayos, cultivo de tejidos, transformación (por ejemplo, electroporación, lipofección), reacciones enzimáticas, purificación y técnicas y procedimientos relacionados pueden realizarse generalmente como se describe en diversas referencias generales y más específicas en microbiología, biología molecular, bioquímica, genética molecular, biología celular, virología e inmunología, como se menciona y analiza a lo largo de la presente descripción. Ver, por ejemplo, Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ra ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, actualizado en julio de 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I y II (IRL Press, Oxford Univ. Press EE. UU., 1985); *Current Protocols in Immunology* (Editado por: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY); *Real-Time PCR: Current Technology and Applications*, Editado por Julie Logan, Kirstin Edwards y Nick Saunders, 2009, Caister Academic Press, Norfolk, Reino Unido; Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, Nueva York, 1992); Guthrie y Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Academic Press, Nueva York, 1991); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, Ed., 1984); *Nucleic Acid The Hybridization* (B. Hames y S. Higgins, Eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames y S. Higgins, Eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, Ed., 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Next-Generation Genome Sequencing* (Janitz, 2008 Wiley-VCH); *PCR Protocols (Methods in Molecular Biology)* (Park, Ed., 3ra Edición, 2010 Humana Press); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Harlow y Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998); *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, vol. I-IV (D. M. Weir y CC Blackwell, eds., 1986); Roitt, *Essential Immunology*, 6ta edición, (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988); *Current Protocols in Immunology* (Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach y W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology*; así como también monografías en revistas tales como *Advances in Immunology*.

B. Definiciones

Antes de exponer esta descripción con más detalle, puede ser útil para la comprensión de esta proporcionar definiciones de ciertos términos a usar en la presente descripción.

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por los expertos en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción puede usarse en la práctica o prueba de modalidades particulares, se describen en la presente descripción las modalidades preferidas de composiciones, métodos y materiales. Para los propósitos de la presente descripción, se

definen los siguientes términos más abajo. Definiciones adicionales se exponen a lo largo de esta descripción.

Los artículos "un", "una" y "el/la" se usan en la presente descripción para referirse a uno o a más de uno (es decir, al menos uno, o a uno o más) del objeto gramatical del artículo. A manera de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o uno o más elementos.

Debe entenderse que el uso de la alternativa (por ejemplo, "o") significa una, ambas o cualquier combinación de estas de las alternativas.

Debe entenderse que el término "y/o" significa una o ambas alternativas.

Como se usa en la presente, el término "aproximadamente" o "aproximadamente" se refiere a una cifra, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía en hasta un 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % con respecto a una cifra, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia. En una modalidad, el término "aproximadamente" o "aproximadamente" se refiere a un intervalo de cifra, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud $\pm 15 \%$, $\pm 10 \%$, $\pm 9 \%$, $\pm 8 \%$, $\pm 7 \%$, $\pm 6 \%$, $\pm 5 \%$, $\pm 4 \%$, $\pm 3 \%$, $\pm 2 \%$ o $\pm 1 \%$ aproximadamente una cifra, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

En una modalidad, un intervalo, por ejemplo, 1 a 5, aproximadamente 1 a 5, o aproximadamente 1 a aproximadamente 5, se refiere a cada valor numérico abarcado por el intervalo. Por ejemplo, en una modalidad no limitante y simplemente ilustrativa, el intervalo "1 a 5" es equivalente a la expresión 1, 2, 3, 4, 5; o 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 o 5,0; o 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 o 5,0.

Como se usa en la presente, el término "sustancialmente" se refiere a una cifra, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que es 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor en comparación con una cifra, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia. En una modalidad, "sustancialmente la misma" se refiere a una cifra, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que produce un efecto, por ejemplo, un efecto fisiológico, que es aproximadamente el mismo que una cifra, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

A lo largo de esta descripción, a menos que el contexto lo requiera de cualquier otra manera, se entenderá que las palabras "comprender", "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos declarados pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos. Por "que consiste de" se entiende que incluye, y se limita a, lo que sigue a la frase "que consiste de". Por tanto, la frase "que consiste de" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos. Por "que consiste esencialmente de" se entiende incluir cualquier elemento enumerado después de la frase, y limitado a otros elementos que no interfieren o contribuyen a la actividad o acción especificada en la descripción para los elementos enumerados. Por tanto, la frase "que consiste esencialmente de" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que no están presentes otros elementos que afecten materialmente la actividad o acción de los elementos enumerados.

La referencia a lo largo de esta descripción a "una modalidad", "una modalidad particular", "una modalidad relacionada", "una cierta modalidad", "una modalidad adicional" o sus combinaciones, significa que un elemento, estructura o característica particular descrita en relación con la modalidad se incluye en al menos una modalidad. Por tanto, las apariciones de las frases anteriores en diversos lugares a lo largo de esta descripción no necesariamente se refieren a la misma modalidad. Además, los elementos, estructuras o características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada en una o más modalidades. También se entiende que la mención positiva de un elemento en una modalidad, sirve como base para excluir el elemento en una modalidad en particular.

C. Receptores de antígenos quiméricos

En diversas modalidades, se proporcionan receptores manipulados genéticamente que redirigen la citotoxicidad de las células efectoras inmunitarias hacia las células cancerosas que expresan CD79A. Estos receptores manipulados genéticamente se denominan en la presente descripción receptores de antígenos quiméricos (CAR). Los CAR son moléculas que combinan la especificidad basada en anticuerpos por un antígeno deseado (por ejemplo, CD79A) con un dominio intracelular que activa el receptor de células T para generar una proteína quimérica que exhibe una actividad inmunitaria celular específica anti-CD79A. Como se usa en la presente, el término "quimérico" describe que se compone de partes de diferentes proteínas o de ADN de diferentes orígenes.

Los CAR comprenden un dominio extracelular (también denominado dominio de unión o dominio de unión específica a antígeno) que se une a CD79A, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular. El acoplamiento del dominio de unión a antígeno anti-CD79A del CAR con CD79A en la superficie de una célula objetivo

da como resultado el agrupamiento del CAR y suministra un estímulo de activación a la célula que contiene el CAR. La principal característica de los CAR es su capacidad para redirigir la especificidad de las células efectoras inmunitarias, desencadenando de esta manera la proliferación, la producción de citocinas, la fagocitosis o la producción de moléculas que pueden mediar la muerte celular de la célula que expresa el antígeno objetivo de una manera independiente del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), explotando las capacidades de direccionamiento específico a células de los anticuerpos monoclonales, ligandos solubles o correceptores específicos de células.

La invención proporciona un CAR que comprende un dominio de unión extracelular que comprende un dominio de unión específica a CD79A; un dominio transmembrana; y uno o más dominios de señalización coestimuladores intracelulares y/o un dominio de señalización primario.

En modalidades particulares, un CAR comprende un dominio de unión extracelular que comprende un anticuerpo anti-CD79A o un fragmento de unión a antígeno de este; uno o más dominios bisagra o dominios espaciadores; un dominio transmembrana incluido; y uno o más dominios de señalización coestimuladores intracelulares y/o un dominio de señalización primario.

1. Dominio de unión

La invención proporciona CAR que comprenden un dominio de unión extracelular que comprende un anticuerpo anti-CD79A o un fragmento de unión a antígeno de este que se une específicamente a un polipéptido CD79A humano expresado en una célula objetivo, por ejemplo, una célula cancerosa. Como se usa en la presente, los términos "dominio de unión", "dominio extracelular", "dominio de unión extracelular", "dominio de unión específica a antígeno" y "dominio de unión específica a antígeno extracelular", se usan indistintamente y proporcionan un CAR con la capacidad de unirse específicamente al antígeno objetivo de interés, por ejemplo, CD79A. El dominio de unión puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante.

Los términos "afinidad de unión específica" o "se une específicamente" o "unida específicamente" o "unión específica" o "se dirige específicamente", como se usan en la presente, describen la unión de un anticuerpo anti-CD79A o fragmento de unión a antígeno de este (o un CAR que comprende el mismo) a CD79A con una mayor afinidad de unión que la unión de fondo. Un dominio de unión (o un CAR que comprende un dominio de unión o una proteína de fusión que contiene un dominio de unión) "se une específicamente" a un polipéptido CD79A si se une o se asocia con CD79A con una afinidad o K_a (es decir, una constante de equilibrio de asociación de una interacción de unión particular con unidades de $1/M$) de, por ejemplo, mayor que o igual a aproximadamente $10^5 M^{-1}$. En ciertas modalidades, un dominio de unión (o una proteína de fusión de este) se une a un objetivo con una K_a mayor o igual a aproximadamente $10^6 M^{-1}$, $10^7 M^{-1}$, $10^8 M^{-1}$, $10^9 M^{-1}$, $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$, $10^{12} M^{-1}$ o $10^{13} M^{-1}$. Los dominios de unión de "alta afinidad" (o proteínas de fusión monocatenarias de estos) se refieren a aquellos dominios de unión con una K_a de al menos $10^7 M^{-1}$, al menos $10^8 M^{-1}$, al menos $10^9 M^{-1}$, al menos $10^{10} M^{-1}$, al menos $10^{11} M^{-1}$, al menos $10^{12} M^{-1}$, al menos $10^{13} M^{-1}$ o mayor.

Alternativamente, la afinidad puede definirse como una constante de equilibrio de disociación (K_d) de una interacción de unión particular con unidades de M (por ejemplo, $10^{-5} M$ a $10^{-13} M$, o menos). Las afinidades de los polipéptidos de dominio de unión y las proteínas CAR de acuerdo con la presente descripción pueden determinarse fácilmente mediante el uso de técnicas convencionales, por ejemplo, mediante ELISA competitivo (ensayo inmunosorbente unido a enzimas), o por asociación de unión, o ensayos de desplazamiento mediante el uso de ligandos marcados, o mediante el uso de un dispositivo de resonancia de plasmones de superficie tal como el Biacore T100, disponible en Biacore, Inc., Piscataway, NJ, o tecnología de biosensor óptico tal como el sistema EPIC o EnSpire que están disponibles en Corning y Perkin Elmer, respectivamente (ver también, por ejemplo, Scatchard y otros (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660; y las patentes de Estados Unidos núms. 5,283,173; 5,468,614, o el equivalente).

En una modalidad, la afinidad de unión específica es aproximadamente 2 veces mayor que la unión de fondo, aproximadamente 5 veces mayor que la unión de fondo, aproximadamente 10 veces mayor que la unión de fondo, aproximadamente 20 veces mayor que la unión de fondo, aproximadamente 50 veces mayor que la unión de fondo, aproximadamente 100 veces mayor que la unión de fondo, o aproximadamente 1000 veces mayor que la unión de fondo o más.

En modalidades particulares, el dominio de unión extracelular de un CAR comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de este. Un "anticuerpo" se refiere a un agente de unión que es un polipéptido que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de la cadena ligera o cadena pesada que reconoce específicamente y se une a un epítipo de un antígeno, tal como un péptido, lípido, polisacárido o ácido nucleico que contiene un determinante antigénico, tal como los reconocidos por una célula inmunitaria. Un "anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de este" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural.

Un "antígeno (Ag)" se refiere a un compuesto, composición o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de células T en un animal, lo que incluye composiciones (tales como una que incluye una

proteína específica del cáncer) que se inyectan o absorben en un animal. Un antígeno reacciona con los productos de la inmunidad humoral o celular específica, lo que incluye aquellos inducidos por antígenos heterólogos, tales como los antígenos descritos. En modalidades particulares, el antígeno objetivo es un epítipo de un polipéptido CD79A.

5 Un "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a la región de un antígeno a la que se une un agente de unión. Los epítipos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegado terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos se conservan típicamente en la exposición a solventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por plegado terciario se pierden típicamente en el tratamiento con solventes desnaturizantes. Un epítipo incluye al menos típicamente 3, y más usualmente, al menos 5, aproximadamente 9, o aproximadamente 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

15 Anticuerpos incluye fragmentos de unión a antígeno de estos, tales como Ig de camélido, Ig NAR, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, dímeros Fab biespecíficos (Fab₂), trímeros Fab trispecíficos (Fab₃), Fv, proteínas Fv de cadena única ("scFv"), bis-scFv, (scFv)₂, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, proteínas Fv estabilizadas con disulfuro ("dsFv"), y anticuerpos de dominio único (sdAb, nanocuerpo) y porciones de anticuerpos de longitud completa responsables de la unión al antígeno. El término también incluye formas manipuladas genéticamente, tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados), anticuerpos heteroconjugados (tales como anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de unión a antígeno de estos. Ver también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3ra Ed, W. H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

25 Como entenderá el experto en la técnica y como se describe en otra parte en la presente descripción, un anticuerpo completo comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena pesada consiste en una región variable y una primera, una segunda y una tercera región constante, mientras que cada cadena ligera consiste en una región variable y una región constante. Las cadenas pesadas de mamíferos se clasifican como α , δ , ϵ , γ y μ . Las cadenas ligeras de mamíferos se clasifican como λ o κ . Las inmunoglobulinas que comprenden las cadenas pesadas α , δ , ϵ , γ y μ se clasifican como inmunoglobulina (Ig)A, IgD, IgE, IgG e IgM. El anticuerpo completo forma una forma de "Y". El tallo de la Y consiste en la segunda y tercera regiones constantes (y para IgE e IgM, la cuarta región constante) de dos cadenas pesadas unidas entre sí y se forman enlaces disulfuro (entre cadenas) en la bisagra. Las cadenas pesadas γ , α y δ tienen una región constante compuesta por tres dominios Ig en tándem (en línea), y una región bisagra para una mayor flexibilidad; las cadenas pesadas μ y ϵ tienen una región constante compuesta por cuatro dominios de inmunoglobulina. La segunda y tercera regiones constantes se denominan como "dominio CH₂" y "dominio CH₃", respectivamente. Cada brazo de la Y incluye la región variable y la primera región constante de una única cadena pesada, unida a las regiones variable y constante de una única cadena ligera. Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada son responsables de la unión al antígeno.

40 Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada contienen una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables, también llamadas "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". Las CDR pueden definirse o identificarse mediante métodos convencionales, tal como mediante la secuencia de acuerdo con Kabat y otros (Wu, TT y Kabat, E. A., J Exp Med. 132(2):211-50, (1970); Borden, P. y Kabat E. A., PNAS, 84: 2440-2443 (1987); (ver, Kabat y otros, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991), o mediante la estructura de acuerdo con Chothia y otros (Chothia, C. y Lesk, A.M., J Mol. Biol., 196(4): 901-917 (1987), Chothia, C. y otros, Nature, 342: 877 - 883 (1989)).

45 Ejemplos ilustrativos de reglas para predecir las CDR de la cadena ligera incluyen: CDR-L1 comienza en aproximadamente el residuo 24, está precedida por una Cys, tiene aproximadamente 10-17 residuos, y es seguida de un Trp (típicamente Trp-Tyr-Gln, pero también, Trp-Leu-Gln, Trp-Phe-Gln, Trp-Tyr-Leu); CDR-L2 comienza aproximadamente 16 residuos después del final de CDR-L1, está generalmente precedida por Ile-Tyr, pero también, Val-Tyr, Ile-Lys, Ile-Phe, y tiene 7 residuos; y CDR-L3 comienza aproximadamente 33 residuos después del final de CDR-L2, está precedida por una Cys, tiene 7-11 residuos, y es seguida de Phe-Gly-XXX-Gly (SEQ ID NO: 76) (XXX es cualquier aminoácido).

55 Ejemplos ilustrativos de reglas para predecir las CDR de la cadena pesada incluyen: CDR-H1 comienza en aproximadamente el residuo 26, está precedida por Cys-XXX-XXX-XXX (SEQ ID NO: 77), tiene 10-12 residuos y es seguida de un Trp (típicamente Trp-Val, pero también, Trp-Ile, Trp-Ala); CDR-H2 comienza aproximadamente 15 residuos después del final de CDR-H1, está generalmente precedida por Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (SEQ ID NO: 78), o varias variaciones, tiene 16-19 residuos, y es seguida de Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala; y CDR-H3 comienza aproximadamente 33 residuos después del final de CDR-H2, está precedida por Cys-XXX-XXX (típicamente Cys-Ala-Arg), tiene de 3 a 25 residuos, y es seguida de Trp-Gly-XXX-Gly (SEQ ID NO: 79).

En una modalidad, las CDR de la cadena ligera y las CDR de la cadena pesada se determinan de acuerdo con el método Kabat

65 En una modalidad, las CDR de la cadena ligera y las CDR2 y CDR3 de la cadena pesada se determinan de acuerdo con el método Kabat, y la CDR1 de la cadena pesada se determina de acuerdo con el método AbM, que es un

consenso entre los métodos Kabat y Clothia, ver por ejemplo, Whitelegg N y Rees AR, *Protein Eng.* dic. 2000;13(12):819-24 y *Methods Mol Biol.* 2004;248:51-91. Los programas para predecir las CDR están disponibles públicamente, por ejemplo, AbYsis (www.bioinf.org.uk/abysis/).

5 Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie, tal como los seres humanos. La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional. Las CDR son responsables primariamente de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan típicamente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente a partir del extremo N-terminal, y también se identifican típicamente por la cadena en la que se ubica la CDR en particular. Por tanto, las CDR ubicadas en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo se denominan CDRH1, CDRH2 y CDRH3, mientras que las CDR ubicadas en el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo se denominan CDRL1, CDRL2 y CDRL3. Los anticuerpos con especificidades diferentes (es decir, diferentes sitios de combinación para diferentes antígenos) tienen diferentes CDR. Aunque son las CDR las que varían de anticuerpo a anticuerpo, solo un número limitado de posiciones de aminoácidos dentro de las CDR están implicadas directamente en la unión al antígeno. Estas posiciones dentro de las CDR se denominan residuos determinantes de la especificidad (SDR). Ejemplos ilustrativos de CDR de la cadena ligera que son adecuadas para construir CAR anti-CD79A incluyen las secuencias de CDR expuestas en las SEQ ID NO: 1-3, 9-11 y 17-19. Ejemplos ilustrativos de CDR de la cadena pesada que son adecuadas para construir CAR anti-CD79A incluyen las secuencias de CDR expuestas en las SEQ ID NO: 4-6, 12-14 y 20-22.

20 Las referencias a "V_L" o "VL" se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, lo que incluye la de un anticuerpo, Fv, scFv, dsFv, Fab, u otro fragmento de anticuerpo como se contempla en la presente descripción. Ejemplos ilustrativos de regiones variables de la cadena ligera que son adecuadas para construir los CAR anti-CD79A contemplados en modalidades particulares, incluyen las secuencias de la región variable de la cadena ligera expuestas en las SEQ ID NO: 7, 15 y 23.

25 Las referencias a "V_H" o "VH" se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina, lo que incluye la de un anticuerpo, Fv, scFv, dsFv, Fab, u otro fragmento de anticuerpo como se contempla en la presente descripción. Ejemplos ilustrativos de regiones variables de la cadena pesada que son adecuadas para construir los CAR anti-CD79A contemplados en modalidades particulares, incluyen las secuencias de la región variable de la cadena pesada expuestas en las SEQ ID NO: 8, 16 y 24.

30 Un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo producido por un único clon de linfocitos B o por una célula en la que se han transfectado los genes de las cadenas ligera y pesada de un solo anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, al generar células formadoras de anticuerpos híbridas a partir de una fusión de células de mieloma con células inmunitarias del bazo. Los anticuerpos monoclonales incluyen los anticuerpos monoclonales humanizados.

35 Un "anticuerpo quimérico" tiene residuos marco de una especie, tal como el ser humano, y CDR (que generalmente confieren unión a antígeno) de otra especie, tal como un ratón. En modalidades preferidas particulares, un CAR comprende un dominio de unión específica a antígeno que es un anticuerpo quimérico o un fragmento de unión a antígeno de este.

40 En modalidades preferidas, el anticuerpo es un anticuerpo humano (tal como un anticuerpo monoclonal humano) o un fragmento de este que se une específicamente a un polipéptido CD79A humano. Los anticuerpos humanos pueden construirse combinando secuencia(es) de dominio variable del clon Fv que se seleccionan de bibliotecas de presentación de fagos derivadas de humanos con secuencia(es) conocidas de dominio constante humano como se describió anteriormente. Alternativamente, los anticuerpos monoclonales humanos pueden generarse mediante el método del hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma humano-ratón para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, por Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur y otros, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner y otros, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991). Además, pueden usarse animales transgénicos (por ejemplo, ratones) para producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de la producción endógena de inmunoglobulinas. Ver, por ejemplo, Jakobovits y otros, *PNAS USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits y otros, *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggermann y otros, *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993). También puede usarse el barajado génico para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos no humanos, por ejemplo, anticuerpos de roedor, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares a las del anticuerpo no humano de partida. (Ver el documento PCT WO 93/06213, publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos mediante el injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos de FR o CDR de origen no humano.

45 En una modalidad, un CAR comprende un anticuerpo "humanizado". Un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina que incluye una región marco humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, de ratón, rata o sintética). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina "donante", y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se denomina "aceptora". En una modalidad, todas las CDR son de la inmunoglobulina donante en una inmunoglobulina humanizada. No es necesario que las regiones constantes

estén presentes, pero si lo están, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de la inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente 85-90 %, tal como aproximadamente 95 % o más idénticas. Por tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de la inmunoglobulina humana natural. Los anticuerpos humanizados u otros anticuerpos monoclonales pueden tener sustituciones conservadoras adicionales de aminoácidos, que no tienen sustancialmente efecto sobre la unión al antígeno u otras funciones de la inmunoglobulina. Los anticuerpos humanizados pueden construirse por medio de ingeniería genética (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 5,585,089).

En modalidades particulares, un anticuerpo anti-CD79A o un fragmento de unión a antígeno de este, incluye una Ig de camélido (un anticuerpo de camélido (VHH)), Ig NAR, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, dímeros Fab biespecíficos (Fab₂), trímeros Fab trispecíficos (Fab₃), Fv, anticuerpo Fv de cadena única ("scFv"), bis-scFv, (scFv)₂, minicuerpo, diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, proteína Fv estabilizada con disulfuro ("dsFv"), y anticuerpo de dominio único (sdAb, nanocuerpo).

"Ig de camélido" o "VHH de camélido", como se usa en la presente, se refiere a la unidad de unión a antígeno conocida más pequeña de un anticuerpo de cadena pesada (Koch-Nolte, y otros, FASEB J., 21: 3490-3498 (2007)). Un "anticuerpo de cadena pesada" o un "anticuerpo de camélido", se refiere a un anticuerpo que contiene dos dominios VH y ninguna cadena ligera (Riechmann L. y otros, J. Immunol. Methods 231:25-38 (1999); documento WO94/04678; documento WO94/25591; patente de Estados Unidos núm. 6,005,079).

"IgNAR" de "nuevo receptor de antígeno de inmunoglobulina" se refiere a la clase de anticuerpos del repertorio inmunitario del tiburón, que consiste en homodímeros de un dominio variable del nuevo receptor de antígeno (VNAR) y cinco dominios constantes del nuevo receptor de antígeno (CNAR). Los IgNAR representan algunos de los andamios de proteínas basados en inmunoglobulina conocidos más pequeños y son altamente estables y poseen características de unión eficientes. La estabilidad inherente puede atribuirse tanto a (i) el andamio de Ig subyacente, que presenta un número considerable de residuos expuestos en la superficie cargados e hidrófilos en comparación con los dominios VH y VL de anticuerpos convencionales que se encuentran en los anticuerpos murinos; como a (ii) elementos estructurales estabilizantes en los bucles de la región determinante de la complementariedad (CDR), lo que incluye puentes disulfuro entre bucles, y patrones de enlaces de hidrógeno intrabucles.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂, que tiene dos sitios de combinación a antígenos y aún es capaz de reticular el antígeno.

"Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En una modalidad, una especie Fv bicatenaria consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y uno de la cadena ligera en asociación estrecha no covalente. En una especie Fv de cadena única (scFv), un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera pueden unirse covalentemente mediante un enlazador peptídico flexible, de manera que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie Fv bicatenaria. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables (HVR) de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. En conjunto, las seis HVR confieren al anticuerpo la especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de las cadenas pesada y ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de la cadena pesada, lo que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente descripción para Fab', en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de la bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos. Los dímeros Fab biespecíficos (Fab₂) tienen dos fragmentos Fab', cada uno de los cuales se une a un antígeno diferente. Los trímeros Fab trispecíficos (Fab₃) tienen tres fragmentos Fab', cada uno de los cuales se une a un antígeno diferente.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en el documento EP 404,097; el documento WO 1993/01161; Hudson y otros, Nat. Med. 9:129-134 (2003); y Hollinger y otros, PNAS USA 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson y otros, Nat. Med. 9:129-134

(2003).

"Anticuerpo de dominio único" o "sdAb" o "nanocuerpo" se refiere a un fragmento de anticuerpo que consiste en la región variable de una cadena pesada de anticuerpo (dominio VH) o la región variable de una cadena ligera de anticuerpo (dominio VL) (Holt, L., y otros, Trends in Biotechnology, 21(11): 484-490).

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica y en cualquier orientación (por ejemplo, VL-VH o VH-VL). Generalmente, el polipéptido scFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, ver, por ejemplo, Pluckthün, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, eds. Rosenberg y Moore, (Springer-Verlag, Nueva York, 1994), págs. 269-315.

En modalidades preferidas, el fragmento de unión a antígeno anti-CD79A es un scFv. En modalidades particulares, el scFv es un scFv murino, humano o humanizado. Los anticuerpos monocatenarios pueden clonarse a partir de genes de región V de un hibridoma específico para un objetivo deseado. La producción de dichos hibridomas se ha vuelto rutinaria. Se ha descrito una técnica que puede usarse para clonar la cadena pesada de la región variable (V_H) y la cadena ligera de la región variable (V_L), por ejemplo, en Orlandi y otros, PNAS, 1989; 86: 3833-3837.

La invención proporciona un anticuerpo anti-CD79A o un fragmento de unión a antígeno de este que comprende una secuencia de la cadena ligera variable que comprende las secuencias de CDRL1-CDRL3 expuestas en las SEQ ID NO: 1-3, 9-11 o 17-19, y/o una secuencia de la cadena pesada variable que comprende las secuencias de CDRH1-CDRH3 expuestas en las SEQ ID NO: 4-6, 12-14. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79A o fragmento de unión a antígeno de este comprende una secuencia de la cadena ligera variable como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 15 o 23 y/o una secuencia de la cadena pesada variable como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 8, 16 o 24.

En modalidades particulares, el dominio de unión específica a antígeno es un scFv que se une a un polipéptido CD79A humano.

Un dominio de unión específica a CD79A ilustrativo es una región variable de inmunoglobulina específica para CD79A que comprende al menos una región marco humana. Una "región marco humana" se refiere a una región marco de tipo silvestre (es decir, de origen natural) de una región variable de inmunoglobulina humana, una región marco alterada de una región variable de inmunoglobulina humana con menos de aproximadamente 50 % (por ejemplo, preferentemente, menos de aproximadamente 45 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, o 1 %) de los aminoácidos en la región eliminados o sustituidos (por ejemplo, con uno o más residuos de aminoácidos de una región marco de inmunoglobulina no humana en posiciones correspondientes), o una región marco alterada de una región variable de inmunoglobulina no humana con menos de aproximadamente 50 % (por ejemplo, menos del 45 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, o 5 %) de los aminoácidos en la región eliminados o sustituidos (por ejemplo, en posiciones de residuos expuestos y/o con uno o más residuos de aminoácidos de una región marco de inmunoglobulina humana en posiciones correspondientes) de manera que, en un aspecto, se reduce la inmunogenicidad.

En ciertas modalidades, una región marco humana es una región marco de tipo silvestre de una región variable de inmunoglobulina humana. En ciertas otras modalidades, una región marco humana es una región marco alterada de una región variable de inmunoglobulina humana con deleciones o sustituciones de aminoácidos en una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más posiciones. En otras modalidades, una región marco humana es una región marco alterada de una región variable de inmunoglobulina no humana con deleciones o sustituciones de aminoácidos en una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más posiciones.

En modalidades particulares, un dominio de unión específica a CD79A comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho regiones marco humanas (FR) seleccionadas de FR1 de cadena ligera humana, FR1 de cadena pesada humana, FR2 de cadena ligera humana, FR2 de cadena pesada humana, FR3 de cadena ligera humana, FR3 de cadena pesada humana, FR4 de cadena ligera humana y FR4 de cadena pesada humana.

Las FR humanas que pueden estar presentes en dominios de unión específica a CD79A incluyen además variantes de las FR ilustrativas proporcionadas en la presente descripción en las que uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más aminoácidos de las FR ilustrativas se han sustituido o eliminado.

En ciertas modalidades, un dominio de unión específica a CD79A comprende (a) una región variable de la cadena ligera humanizada que comprende una FR1 de cadena ligera humana, una FR2 de cadena ligera humana, una FR3 de cadena ligera humana y una FR4 de cadena ligera humana, y (b) una región variable de la cadena pesada humanizada que comprende una FR1 de cadena pesada humana, una FR2 de cadena pesada humana, una FR3 de cadena pesada humana y una FR4 de cadena pesada humana.

Los dominios de unión específica a CD79A proporcionados en la presente descripción también comprenden una, dos,

tres, cuatro, cinco o seis CDR. Dichas CDR pueden ser CDR no humanas o CDR no humanas alteradas seleccionadas de CDRL1, CDRL2 y CDRL3 de la cadena ligera y CDRH1, CDRH2 y CDRH3 de la cadena pesada. La invención proporciona un dominio de unión específica a CD79A que comprende (a) una región variable de la cadena ligera que comprende una CDRL1 de la cadena ligera, una CDRL2 de la cadena ligera y una CDRL3 de la cadena ligera, y (b) una región variable de la cadena pesada que comprende una CDRH1 de la cadena pesada, una CDRH2 de la cadena pesada y una CDRH3 de la cadena pesada.

Un anticuerpo anti-CD79A o un fragmento de unión a antígeno de este puede comprender una secuencia de la cadena ligera variable que comprende secuencias de CDRL1-CDRL3 con al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 1-3, 9-11, o 17-19 y/o una secuencia de la cadena pesada variable que comprende secuencias de CDRH1-CDRH3 con al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 4-6, 12-14 o 20-22.

La invención proporciona un dominio de unión específica a CD79A que comprende las secuencias de CDR de la cadena ligera expuestas en las SEQ ID NO: 1-3, 9-11 o 17-19. Un dominio de unión específica a CD79A puede comprender secuencias de CDR de la cadena ligera con al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de aminoácidos con las secuencias de CDR de la cadena ligera expuestas en las SEQ ID NO: 1-3, 9-11 o 17-19.

La invención proporciona un dominio de unión específica a CD79A que comprende las secuencias de CDR de la cadena pesada expuestas en las SEQ ID NO: 4-6, 12-14 o 20-22. Un dominio de unión específica a CD79A puede comprender secuencias de CDR de la cadena pesada con al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de aminoácidos con las secuencias de CDR de la cadena pesada expuestas en las SEQ ID NO: 4-6, 12-14 o 20-22.

En algunas modalidades, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno de este comprende una secuencia de la cadena ligera variable con al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 15 o 23 y/o una secuencia de la cadena pesada variable con al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 8, 16 o 24.

2. Enlazadores

En ciertas modalidades, los CAR anti-CD79A comprenden residuos enlazadores entre los diversos dominios, por ejemplo, añadidos para la separación y conformación apropiadas de la molécula. En modalidades particulares, el enlazador es una secuencia de enlace de la región variable. Una "secuencia de enlace de la región variable", es una secuencia de aminoácidos que conecta los dominios V_H y V_L y proporciona una función espaciadora compatible con la interacción de los dos subdominios de unión, de modo que el polipéptido resultante conserva una afinidad de unión específica a la misma molécula objetivo que un anticuerpo que comprende las mismas regiones variables de las cadenas ligera y pesada. En modalidades particulares, los CAR comprenden uno, dos, tres, cuatro o cinco o más enlazadores. En modalidades particulares, la longitud de un enlazador es aproximadamente 1 a aproximadamente 25 aminoácidos, aproximadamente 5 a aproximadamente 20 aminoácidos, o aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos, o cualquier longitud intermedia de aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más aminoácidos de longitud.

Ejemplos ilustrativos de enlazadores incluyen polímeros de glicina (G)_n; polímeros de glicina-serina ($G_{1-5}S_{1-5}$)_n, donde n es un número entero de al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco; polímeros de glicina-alanina; polímeros de alanina-serina; y otros enlazadores flexibles conocidos en la técnica. Los polímeros de glicina y glicina-serina son relativamente no estructurados, y por lo tanto, pueden servir como una unión neutra entre dominios de proteínas de fusión tales como los CAR descritos en la presente descripción. La glicina accede a significativamente más espacio phi-psi que incluso la alanina, y está mucho menos restringida que los residuos con cadenas laterales más largas (ver Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). El experto en la técnica reconocerá que el diseño de un CAR en modalidades particulares puede incluir enlazadores que son todos flexibles o parcialmente, de manera que el enlazador puede incluir un enlazador flexible, así como también una o más porciones que confieren una estructura menos flexible para proporcionar una estructura de CAR deseada.

Otros enlazadores ilustrativos incluyen las siguientes secuencias de aminoácidos: DGGGS (SEQ ID NO: 39); TGEKP (SEQ ID NO: 40) (ver, por ejemplo, Liu y otros, PNAS 5525-5530 (1997)); GGRR (SEQ ID NO: 41) (Pomerantz y otros, 1995, supra); (GGGS)_n, en donde $n = 1, 2, 3, 4$ o 5 (SEQ ID NO: 42) (Kim y otros, PNAS 93, 1156-1160 (1996)); EGKSSVSGSESKVD (SEQ ID NO: 43) (Chaudhary y otros, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1066-1070); KESGSVSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 44) (Bird y otros, 1988, Science 242:423-426), GGRGGGS (SEQ ID NO: 45); LRQRDGERP (SEQ ID NO: 46); LRQKGGGSRP (SEQ ID NO: 47); LRQKD(GGG)₂ ERP (SEQ ID NO: 48). Alternativamente, los enlazadores flexibles pueden diseñarse racionalmente mediante el uso de un programa de

computadora capaz de modelar tanto los sitios de unión al ADN como los péptidos en sí mismos (Desjarlais y Berg, PNAS 90:2256-2260 (1993), PNAS 91:11099-11103 (1994) o mediante métodos de presentación en fagos. En una modalidad, el enlazador comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 49) (Cooper y otros, Blood, 101(4): 1637-1644 (2003)).

3. Dominio espaciador

En modalidades particulares, el dominio de unión de un CAR anti-CD79A es seguido de uno o más "dominios espaciadores", que se refiere a la región que aleja el dominio de unión a antígeno de la superficie de la célula efectora para permitir un contacto célula/célula, unión a antígeno y activación adecuados (Patel y otros, Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). El dominio bisagra puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. En ciertas modalidades, un dominio espaciador es una porción de una inmunoglobulina, lo que incluye una o más regiones constantes de la cadena pesada, por ejemplo, CH2 y CH3. El dominio espaciador puede incluir la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de inmunoglobulina de origen natural o una región bisagra de inmunoglobulina alterada.

En una modalidad, el dominio espaciador comprende las CH2 y CH3 de IgG1, IgG4 o IgD.

4. Dominio bisagra

El dominio de unión de un CAR anti-CD79A es seguido generalmente de uno o más "dominios bisagra", que desempeñan un papel en la colocación del dominio de unión a antígeno lejos de la superficie de la célula efectora para permitir un contacto célula/célula, unión a antígeno y activación adecuados. Un CAR anti-CD79A comprende generalmente uno o más dominios bisagra entre el dominio de unión y el dominio transmembrana (TM). El dominio bisagra puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. El dominio bisagra puede incluir la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de inmunoglobulina de origen natural o una región bisagra de inmunoglobulina alterada.

Una "región bisagra alterada" se refiere a (a) una región bisagra de origen natural con hasta 30 % de cambios de aminoácidos (por ejemplo, hasta 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de sustituciones o deleciones de aminoácidos), (b) una porción de una región bisagra de origen natural que tiene al menos 10 aminoácidos (por ejemplo, al menos 12, 13, 14 o 15 aminoácidos) de longitud con hasta 30 % de cambios de aminoácidos (por ejemplo, hasta 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de sustituciones o deleciones de aminoácidos), o (c) una porción de una región bisagra de origen natural que comprende la región bisagra central (que puede tener 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, o al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos de longitud). En ciertas modalidades, uno o más residuos de cisteína en una región bisagra de inmunoglobulina de origen natural pueden sustituirse por uno o más residuos de aminoácidos diferentes (por ejemplo, uno o más residuos de serina). Una región bisagra de inmunoglobulina alterada puede tener alternativa o adicionalmente un residuo de prolina de una región bisagra de inmunoglobulina de tipo silvestre sustituida por otro residuo de aminoácido (por ejemplo, un residuo de serina).

Los dominios bisagra ilustrativos adecuados para su uso en los CAR descritos en la presente descripción incluyen la región bisagra derivada de las regiones extracelulares de proteínas de membrana tipo 1 tales como CD8 α y CD4, que pueden ser regiones bisagra de tipo silvestre de estas moléculas o pueden estar alteradas. En una modalidad, la bisagra es una bisagra PD-1 o bisagra CD152. En otra modalidad, el dominio bisagra comprende una región bisagra CD8 α .

5. Dominio transmembrana (TM)

El "dominio transmembrana" es la porción de un CAR anti-CD79A que fusiona la porción de unión extracelular y el dominio de señalización intracelular, y ancla el CAR a la membrana plasmática de la célula efectora inmunitaria. El dominio TM puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. El dominio TM puede derivarse de (es decir, comprende al menos la(s) región(ones) transmembrana de la cadena alfa o beta del receptor de células T, CD δ , CD3 ϵ , CD γ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD154 y PD1. En una modalidad particular, el dominio TM es sintético y comprende predominantemente residuos hidrófobos tales como leucina y valina.

En una modalidad, los CAR comprenden un dominio TM derivado de PD1, CD152, CD28 o CD8 α . En otra modalidad, un CAR comprende un dominio TM derivado de PD1, CD152, CD28 o CD8 α y un enlazador oligo o polipeptídico corto, preferentemente, entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de longitud, que une el dominio TM y el dominio de señalización intracelular del CAR. Un enlazador basado en glicina-serina proporciona un enlazador particularmente adecuado.

6. Dominio de señalización intracelular

La invención proporciona CAR anti-CD79A que comprenden uno o más dominios de señalización intracelular. Un "dominio de señalización intracelular", se refiere a la parte de un CAR que participa en la transducción del mensaje de

unión efectiva del CAR anti-CD79A a un polipéptido CD79A humano en el interior de la célula efectora inmunitaria para inducir la función de la célula efectora, por ejemplo, activación, producción de citocinas, proliferación y actividad citotóxica, lo que incluye la liberación de factores citotóxicos a la célula objetivo unida al CAR, u otras respuestas celulares inducidas por la unión del antígeno al dominio CAR extracelular.

5 El término "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula efectora inmunitaria. La función efectora de la célula T, por ejemplo, puede ser la actividad citolítica o la actividad auxiliar, lo que incluye la secreción de una citocina. Por tanto, el término "dominio de señalización intracelular" se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y que dirige a la célula a realizar una función especializada. Aunque
10 usualmente puede emplearse el dominio de señalización intracelular completo, en muchos casos no es necesario usar todo el dominio. En la medida en que se usa una porción truncada de un dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada puede usarse en lugar del dominio completo, siempre que transduzca la señal de la función efectora. El término dominio de señalización intracelular pretende incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función efectora.

15 Se conoce que las señales generadas a través de solo el TCR son insuficientes para la activación completa de la célula T y que también se requiere una señal secundaria o coestimuladora. Por tanto, puede decirse que la activación de las células T está mediada por dos clases distintas de dominios de señalización intracelular: dominios de señalización primarios que inician la activación primaria dependiente de antígeno a través del TCR (por ejemplo, un complejo TCR/CD3) y dominios de señalización coestimuladores que actúan de manera independiente de antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora. La invención proporciona un CAR que comprende un dominio de señalización intracelular que comprende uno o más "dominios de señalización coestimuladores" y un "dominio de señalización primario".

20 Los dominios de señalización primarios regulan la activación primaria del complejo TCR, ya sea de manera estimuladora o de manera inhibitoria. Los dominios de señalización primarios que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación de inmunorreceptor basados en tirosina o ITAM.

25 Ejemplos ilustrativos de ITAM que contienen dominios de señalización primarios que son útiles en modalidades particulares incluyen los derivados de FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En modalidades preferidas particulares, un CAR anti-CD79A comprende un dominio de señalización primario CD3 ζ y uno o más dominios de señalización coestimuladores. Los dominios de señalización primarios y de señalización coestimuladores intracelulares pueden unirse en cualquier orden en tándem al extremo carboxilo terminal del dominio transmembrana.

30 En modalidades particulares, los CAR comprenden uno o más dominios de señalización coestimuladores para potenciar la eficacia y expansión de las células T que expresan receptores CAR. Como se usa en la presente, el término "dominio de señalización coestimulador" o "dominio coestimulador", se refiere a un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de la superficie celular que no son receptores de antígeno o receptores Fc que proporcionan una segunda señal requerida para una activación y función eficientes de los linfocitos T tras la unión al antígeno. Ejemplos ilustrativos de dichas moléculas coestimuladoras incluyen TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM y ZAP70. En una modalidad, un CAR comprende uno o más dominios de señalización coestimuladores seleccionados del grupo que consiste en CD28, CD137 y CD134, y un dominio de señalización primario CD3 ζ .

35 En otra modalidad, un CAR comprende dominios de señalización coestimuladores CD28 y CD137 y un dominio de señalización primario CD3 ζ .

40 En aún otra modalidad, un CAR comprende dominios de señalización coestimuladores CD28 y CD134 y un dominio de señalización primario CD3 ζ .

45 En una modalidad, un CAR comprende dominios de señalización coestimuladores CD137 y CD134 y un dominio de señalización primario CD3 ζ .

50 En una modalidad, un CAR comprende un dominio de señalización coestimulador CD137 y un dominio de señalización primario CD3 ζ .

55 En una modalidad, un CAR comprende un dominio de señalización coestimulador CD134 y un dominio de señalización primario CD3 ζ .

60 En una modalidad, un CAR comprende un dominio de señalización coestimulador CD28 y un dominio de señalización primario CD3 ζ .

65 En una modalidad, un CAR comprende un dominio de señalización coestimulador CD28 y un dominio de señalización primario CD3 ζ .

En modalidades particulares, los CAR comprenden un anticuerpo anti-CD79A o un fragmento de unión a antígeno de este que se une específicamente a un polipéptido CD79A expresado en una célula cancerosa.

En una modalidad, un CAR comprende un scFv anti-CD79A que se une a un polipéptido CD79A; un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: cadena alfa o beta del receptor de células T, CD δ , CD3 ϵ , CD γ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD154, AMN1 y PD1; y uno o más dominios de señalización coestimuladores intracelulares de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM y ZAP70; y un dominio de señalización primario de FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b y CD66d.

En una modalidad, un CAR comprende un scFv anti-CD79A que se une a un polipéptido CD79A; un dominio bisagra seleccionado del grupo que consiste en: bisagra de IgG1/CH2/CH3, bisagra de IgG4/CH2/CH3, una bisagra PD1, una bisagra CD152 y una bisagra CD8 α ; un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: cadena alfa o beta del receptor de células T, CD δ , CD3 ϵ , CD γ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD154, AMN1 y PD1; y uno o más dominios de señalización coestimuladores intracelulares de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM y ZAP70; y un dominio de señalización primario de FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b y CD66d.

En una modalidad, un CAR comprende un scFv anti-CD79A que se une a un polipéptido CD79A; un dominio bisagra seleccionado del grupo que consiste en: bisagra de IgG1/CH2/CH3, bisagra de IgG4/CH2/CH3, una bisagra PD1, una bisagra CD152, y una bisagra CD8 α ; un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: cadena alfa o beta del receptor de células T, CD δ , CD3 ϵ , CD γ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD154, AMN1 y PD1; un enlazador oligo o polipeptídico corto, preferentemente, entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de longitud, que une el dominio TM al dominio de señalización intracelular del CAR; y uno o más dominios de señalización coestimuladores intracelulares de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM y ZAP70; y un dominio de señalización primario de FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b y CD66d.

En una modalidad particular, un CAR comprende un scFv anti-CD79A que se une a un polipéptido CD79A; un dominio bisagra que comprende un polipéptido bisagra de IgG1/CH2/CH3 y un polipéptido CD8 α ; un dominio transmembrana CD8 α que comprende un enlazador polipeptídico de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 aminoácidos; un dominio de señalización coestimulador intracelular CD137; y un dominio de señalización primario CD3 ζ .

En una modalidad particular, un CAR comprende un scFv anti-CD79A que se une a un polipéptido CD79A; un dominio bisagra que comprende un polipéptido CD8 α ; un dominio transmembrana CD8 α que comprende un enlazador polipeptídico de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 aminoácidos; un dominio de señalización coestimulador intracelular CD134; y un dominio de señalización primario CD3 ζ .

En una modalidad particular, un CAR comprende un scFv anti-CD79A que se une a un polipéptido CD79A; un dominio bisagra que comprende un polipéptido CD8 α ; un dominio transmembrana CD8 α que comprende un enlazador polipeptídico de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 aminoácidos; un dominio de señalización coestimulador intracelular CD28; y un dominio de señalización primario CD3 ζ .

El diseño de los CAR contemplados en modalidades particulares permite una expansión mejorada, persistencia a largo plazo y propiedades citotóxicas en las células T que expresan los CAR en comparación con las células T no modificadas o células T modificadas para expresar otros CAR.

D. Polipéptidos

En la presente descripción se contemplan diversos polipéptidos, polipéptidos de fusión y variantes polipeptídicas, lo que incluye polipéptidos CAR y fragmentos de estos. En modalidades preferidas, se proporciona un polipéptido que comprende uno o más CAR. En modalidades particulares, el CAR es un CAR anti-CD79A que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 25-30.

"Polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente, a menos que se especifique lo contrario, y de acuerdo con el significado convencional, es decir, como una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos no se limitan a una longitud específica, por ejemplo, pueden comprender un polipéptido de longitud completa o un fragmento de polipéptido, y pueden incluir una o más modificaciones postraduccionales del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, y similares, así como también otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de

origen natural como de origen no natural. En diversas modalidades, los polipéptidos CAR comprenden una secuencia señal (o líder) en el extremo N-terminal de la proteína, que dirige cotraduccional o postraduccionalmente la transferencia de la proteína. Ejemplos ilustrativos de secuencias señal adecuadas útiles en los CAR contemplados en modalidades particulares, incluyen el polipéptido señal de cadena pesada de IgG1, un polipéptido señal CD8 α o un polipéptido señal del receptor alfa de GM-CSF humano. Los polipéptidos pueden prepararse mediante el uso de cualquiera de una variedad de técnicas recombinantes y/o sintéticas bien conocidas. Los polipéptidos contemplados en la presente descripción abarcan los CAR de la presente descripción, o secuencias que tienen delecciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de un CAR contemplado en la presente descripción.

Un "polipéptido aislado" y similares, como se usa en la presente, se refiere a la síntesis, aislamiento y/o purificación in vitro de un péptido o molécula polipeptídica a partir de un ambiente celular, y de la asociación con otros componentes de la célula, es decir, no está asociado significativamente con sustancias in vivo. En modalidades particulares, un polipéptido aislado es un polipéptido sintético, un polipéptido semisintético, o un polipéptido obtenido o derivado de una fuente recombinante.

Polipéptidos incluye "variantes polipeptídicas". Las variantes polipeptídicas pueden diferir de un polipéptido de origen natural en una o más sustituciones, delecciones, adiciones y/o inserciones. Dichas variantes pueden ser de origen natural o pueden generarse sintéticamente, por ejemplo, al modificar una o más de las secuencias polipeptídicas anteriores. Por ejemplo, en modalidades particulares, puede ser conveniente mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de los CAR mediante la introducción de una o más sustituciones, delecciones, adiciones y/o inserciones en un dominio de unión, bisagra, dominio TM, dominio de señalización coestimulador o dominio de señalización primario de un polipéptido CAR. En modalidades particulares, los polipéptidos incluyen polipéptidos que tienen al menos aproximadamente 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de referencia contempladas en la presente descripción, típicamente, donde la variante mantiene al menos una actividad biológica de la secuencia de referencia. En modalidades particulares, la actividad biológica es afinidad de unión. En modalidades particulares, la actividad biológica es actividad citolítica.

Polipéptidos incluye "fragmentos polipeptídicos". Los fragmentos polipeptídicos se refieren a un polipéptido, que puede ser monomérico o multimérico, que tiene una delección amino terminal, una delección carboxilo terminal y/o una delección o sustitución interna de un polipéptido de origen natural o producido de manera recombinante. Ejemplos ilustrativos de fragmentos polipeptídicos biológicamente activos incluyen los fragmentos de anticuerpos. Como se usa en la presente, el término "fragmento biológicamente activo" o "fragmento biológicamente activo mínimo" se refiere a un fragmento polipeptídico que conserva al menos 100 %, al menos 90 %, al menos 80 %, al menos 70 %, al menos 60 %, al menos 50 %, al menos 40 %, al menos 30 %, al menos 20 %, al menos 10 % o al menos 5 % de la actividad del polipéptido de origen natural. En modalidades preferidas, la actividad biológica es la afinidad de unión a un idiotipo. En ciertas modalidades, un fragmento polipeptídico puede comprender una cadena de aminoácidos de al menos 5 a aproximadamente 500 aminoácidos de longitud. Se apreciará que en ciertas modalidades, los fragmentos tienen al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 450 aminoácidos de longitud. Los fragmentos polipeptídicos particularmente útiles incluyen dominios funcionales, lo que incluye dominios de unión a antígeno o fragmentos de anticuerpos. En el caso de un anticuerpo anti-CD79A, los fragmentos útiles incluyen: una región CDR, una región CDR3 de la cadena pesada o ligera; una región variable de una cadena pesada o ligera; una porción de una cadena de anticuerpo o región variable que incluye dos CDR; y similares.

El polipéptido también puede fusionarse en marco o conjugarse a un enlazador u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido (por ejemplo, poli-His), o para potenciar la unión del polipéptido a un soporte sólido.

Como se indicó anteriormente, en modalidades particulares, los polipéptidos pueden alterarse de diversas maneras, lo que incluye sustituciones, delecciones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. Los métodos para dichas manipulaciones se conocen generalmente en la técnica. Por ejemplo, las variantes de secuencia de aminoácidos de un polipéptido de referencia pueden prepararse mediante mutaciones en el ADN. Los métodos para la mutagénesis y las alteraciones de la secuencia de nucleótidos se conocen bien en la técnica. Ver, por ejemplo, Kunkel (1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 488-492), Kunkel y otros, (1987, Methods in Enzymol, 154: 367-382), patente de Estados Unidos núm. 4,873,192, Watson, J. D. y otros, (Molecular Biology of the Gene, Cuarta edición, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) y las referencias citadas en ellos. En el modelo de Dayhoff y otros, (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.) puede encontrarse una guía para sustituciones de aminoácidos adecuadas que no afecten la actividad biológica de la proteína de interés.

En ciertas modalidades, una variante polipeptídica comprende una o más sustituciones conservadoras. Una "sustitución conservadora" es una en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de manera que un experto en la técnica de la química peptídica esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido no cambiasen sustancialmente. Pueden realizarse modificaciones en la

estructura de los polinucleótidos y polipéptidos contemplados en modalidades particulares, y aun así obtener una molécula funcional que codifica una variante o derivado polipeptídico con características convenientes. Cuando se desea alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido para crear una variante polipeptídica equivalente, o incluso una mejorada, un experto en la técnica, por ejemplo, puede cambiar uno o más de los codones de la secuencia de ADN codificante, por ejemplo, de acuerdo con la Tabla 1.

Tabla 1: Codones de aminoácidos

Aminoácidos	Código de una letra	Código de tres letras	Codones					
Alanina	A	Ala	GCA	GCC	GCG	GCU		
Cisteína	C	Cys	UGC	UGU				
Ácido aspártico	D	Asp	GAC	GAU				
Ácido glutámico	E	Glu	GAA	GAG				
Fenilalanina	F	Phe	UUC	UUU				
Glicina	G	Gly	GGA	GGC	GGG	GGU		
Histidina	H	His	CAC	CAU				
Isoleucina	I	Iso	AUA	AUC	AUU			
Lisina	K	Lys	AAA	AAG				
Leucina	L	Leu	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Metionina	M	Met	AUG					
Asparagina	N	Asn	AAC	AAU				
Prolina	P	Pro	CCA	CCC	CCG	CCU		
Glutamina	Q	Gln	CAA	CAG				
Arginina	R	Arg	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Serina	s	Ser	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Treonina	T	Thr	ACA	ACC	ACG	ACU		
Valina	V	Val	GUA	GUC	GUG	GUU		
Triptófano	W	Trp	UGG					
Tirosina	Y	Tyr	UAC	UAU				

La guía para determinar qué residuos de aminoácidos pueden sustituirse, insertarse o eliminarse sin abolir la actividad biológica puede encontrarse mediante el uso de programas de computadora bien conocidos en la técnica, tales como el software DNASTAR, DNA Strider, Geneious, Mac Vector o Vector NTI. Preferentemente, los cambios de aminoácidos en las variantes de proteínas descritas en la presente descripción son cambios conservadores de aminoácidos, es decir, sustituciones de aminoácidos no cargados o cargados de manera similar. Un cambio conservador de aminoácidos implica la sustitución de una de una familia de aminoácidos que se relacionan en sus cadenas laterales. Los aminoácidos de origen natural se dividen generalmente en cuatro familias: aminoácidos ácidos (aspartato, glutamato), básicos (lisina, arginina, histidina), no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) y polares no cargados (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican a veces conjuntamente como aminoácidos aromáticos. En un péptido o proteína, los expertos en esta técnica conocen las sustituciones de aminoácidos conservadoras adecuadas y pueden realizarse generalmente sin alterar una actividad biológica de una molécula resultante. Los expertos en esta técnica reconocen que, en general, las sustituciones de un solo aminoácido en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (ver, por ejemplo, Watson y otros, *Molecular Biology of the Gene*, 4ta edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., pág. 224).

Como se indicó anteriormente, las sustituciones de aminoácidos pueden basarse en la similitud relativa de los sustituyentes de las cadenas laterales de los aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño, y similares.

Las variantes polipeptídicas incluyen además formas glicosiladas, conjugados agregados con otras moléculas, y conjugados covalentes con restos químicos no relacionados (por ejemplo, moléculas pegiladas). Las variantes covalentes pueden prepararse mediante el enlace de funcionalidades a grupos que se encuentran en la cadena del

aminoácido o en el residuo N- o C-terminal, como se conoce en la técnica. Las variantes también incluyen variantes alélicas, variantes de especies y muteínas. También son variantes los truncamientos o deleciones de regiones que no afectan la actividad funcional de las proteínas.

5 En una modalidad, donde se desea la expresión de dos o más polipéptidos, las secuencias de polinucleótidos que los codifican pueden separarse mediante una secuencia IRES como se analiza en otra parte en la presente descripción. En otra modalidad, dos o más polipéptidos pueden expresarse como una proteína de fusión que comprende una o más secuencias de polipéptidos autoescindibles.

10 Los polipéptidos contemplados en modalidades particulares incluyen polipéptidos de fusión. En modalidades preferidas, se proporcionan polipéptidos de fusión y polinucleótidos que codifican polipéptidos de fusión, por ejemplo, los CAR. Polipéptidos de fusión y proteínas de fusión se refieren a un polipéptido que tiene al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez o más segmentos de polipéptidos. Los polipéptidos de fusión se enlazan típicamente del extremo C-terminal al extremo N-terminal, aunque también pueden enlazarse del extremo C-terminal al extremo C-terminal, del extremo N-terminal al extremo N-terminal, o del extremo N-terminal al extremo C-terminal.
15 Los polipéptidos de la proteína de fusión pueden estar en cualquier orden o en un orden especificado. Los polipéptidos de fusión o proteínas de fusión pueden incluir, además, variantes modificadas conservadoramente, variantes polimórficas, alelos, mutantes, subsecuencias y homólogos interespecies, siempre que se conserve la actividad transcripcional deseada del polipéptido de fusión. Los polipéptidos de fusión pueden producirse mediante métodos de síntesis química o mediante enlace químico entre los dos restos o pueden prepararse generalmente mediante el uso de otras técnicas estándar. Las secuencias de ADN ligadas que comprenden el polipéptido de fusión están unidas operativamente a elementos de control transcripcionales o traduccionales adecuados como se analiza en otra parte en la presente descripción.

25 En una modalidad, un asociado de fusión comprende una secuencia que ayuda a expresar la proteína (un potenciador de la expresión) a rendimientos más altos que la proteína recombinante nativa. Pueden seleccionarse otros asociados de fusión para aumentar la solubilidad de la proteína o para permitir que la proteína se dirija a los compartimientos intracelulares deseados o para facilitar el transporte de la proteína de fusión a través de la membrana celular.

30 Los polipéptidos de fusión pueden comprender además una señal de escisión de polipéptidos entre cada uno de los dominios polipeptídicos descritos en la presente descripción. Además, un sitio de escisión del polipéptido puede colocarse en cualquier secuencia peptídica enlazadora. Las señales de escisión de polipéptidos ilustrativas incluyen sitios de reconocimiento de escisión de polipéptidos tales como sitios de escisión por proteasas, sitios de escisión por nucleasas (por ejemplo, sitios de reconocimiento de enzimas de restricción raras, sitios de reconocimiento de ribozimas autoescindibles) y oligopéptidos virales autoescindibles (ver deFelipe y Ryan, 2004. *Traffic*, 5(8); 616-26).

El experto en la técnica conoce los sitios de escisión por proteasas y los péptidos autoescindibles adecuados (ver, por ejemplo, en Ryan y otros, 1997. *J. Gener. Virol.* 78, 699-722; Scymczak y otros (2004) *Nature Biotech.* 5, 589-594).
40 Los sitios de escisión por proteasas ilustrativos incluyen los sitios de escisión por proteasas de potyvirus NIa (por ejemplo, proteasa del virus del grabado del tabaco), proteasas de potyvirus HC, proteasas de potyvirus P1 (P35), proteasas de byovirus NIa, proteasas codificadas por ARN-2 de byovirus, proteasas de aftovirus L, proteasas de enterovirus 2A, proteasas de rinovirus 2A, proteasas de picorna 3C, proteasas de comovirus 24K, proteasas de nepovirus 24K, proteasa similar a 3C de RTSV (virus esférico del tungro del arroz), proteasa similar a 3C de PYVF (virus de la mancha amarilla de la chirivía), heparina, trombina, factor Xa y enteroquinasa. Debido a su alta rigurosidad de escisión, se prefieren en una modalidad los sitios de escisión por proteasa de TEV (virus del grabado del tabaco),
45 por ejemplo, EXXYXQ(G/S) (SEQ ID NO: 50), por ejemplo, ENLYFQG (SEQ ID NO: 51) y ENLYFQS (SEQ ID NO: 52), en donde X representa cualquier aminoácido (la escisión por TEV se produce entre Q y G o Q y S).

50 En modalidades particulares, la señal de escisión de polipéptidos es una secuencia peptídica autoescindible viral o una secuencia de salto ribosomal.

Los ejemplos ilustrativos de secuencias de salto ribosomal incluyen: un sitio, secuencia o dominio 2A o similar a 2A (Donnelly y otros, 2001. *J. Gen. Virol.* 82:1027-1041). En una modalidad particular, el péptido 2A viral es un péptido de aftovirus 2A, un péptido 2A de potyvirus o un péptido 2A de cardiovirus.

55 En una modalidad, el péptido 2A viral se selecciona del grupo que consiste en: un péptido 2A del virus de la enfermedad de pies y boca (FMDV), un péptido 2A del virus de la rinitis equina A (ERAV), un péptido 2A del virus Thosaesa asigna (TaV), un péptido 2A del teschovirus porcino-1 (PTV-1), un péptido 2A del Theilovirus y un péptido 2A del virus de la encefalomiocarditis.

60 Ejemplos ilustrativos de sitios 2A se proporcionan en la Tabla 2.

65

Tabla 2

SEQ ID NO: 53	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
SEQ ID NO: 54	ATNFSLLKQAGDVEENPGP
SEQ ID NO: 55	LLKQAGDVEENPGP
SEQ ID NO: 56	GSGEGRGSLTTCGDVEENPGP
SEQ ID NO: 57	EGRGSLTTCGDVEENPGP
SEQ ID NO: 58	LLTCGDVEENPGP
SEQ ID NO: 59	GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 60	QCTNYALLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 61	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 62	GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 63	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 64	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 65	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 66	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 67	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 68	NFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 69	QLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 70	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 71	VTELLYRMKRAETYCPRLAIHPTEARHKQKIVAPVKQT
SEQ ID NO: 72	LNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 73	LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 74	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

En modalidades preferidas, un polipéptido comprende un polipéptido CAR anti-CD79A.

E. Polinucleótidos

En modalidades preferidas, se proporciona un polinucleótido que codifica uno o más polipéptidos CAR. Como se usa en la presente, los términos "polinucleótido" o "ácido nucleico" se refieren al ácido desoxirribonucleico (ADN), al ácido ribonucleico (ARN) y a los híbridos ADN/ARN. Los polinucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios y recombinantes, sintéticos o aislados. Los polinucleótidos incluyen: pre-ARN mensajero (pre-ARNm), ARN mensajero (ARNm), ARN, ADN genómico (ADNg), ADN amplificado por PCR, ADN complementario (ADNc), ADN sintético o ADN recombinante. Polinucleótidos se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400, al menos 500, al menos 1000, al menos 5000, al menos 10 000, o al menos 15 000 o más nucleótidos de longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido, así como también todas las longitudes intermedias. Se entenderá fácilmente que "longitudes intermedias", en este contexto, significa cualquier longitud entre los valores citados, tal como 6, 7, 8, 9, etc., 101, 102, 103, etc.; 151, 152, 153, etc.; 201, 202, 203, etc. En modalidades particulares, los polinucleótidos o variantes tienen al menos o aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de referencia.

Ejemplos ilustrativos de polinucleótidos incluyen las SEQ ID NO: 31-36 y los polinucleótidos que codifican las SEQ ID NO: 1-30.

Como se usa en la presente, "polinucleótido aislado" se refiere a un polinucleótido que se ha purificado de las secuencias que lo flanquean en un estado de origen natural, por ejemplo, un fragmento de ADN que se ha extraído de las secuencias que están normalmente adyacentes al fragmento. En modalidades particulares, un "polinucleótido aislado" se refiere además a un ADN complementario (ADNc), un ADN recombinante u otro polinucleótido que no existe en la naturaleza y que se ha producido por la mano del hombre. En modalidades particulares, un polinucleótido

aislado es un polinucleótido sintético, un polinucleótido semisintético, o un polinucleótido obtenido o derivado a partir de una fuente recombinante.

5 En diversas modalidades, un polinucleótido comprende un ARNm que codifica un polipéptido contemplado en la presente descripción. En ciertas modalidades, el ARNm comprende una caperuza, uno o más nucleótidos, y una cola poli(A).

10 En modalidades particulares, los polinucleótidos pueden optimizarse en codones. Como se usa en la presente, el término "optimizado en codones" se refiere a la sustitución de codones en un polinucleótido que codifica un polipéptido para aumentar la expresión, estabilidad y/o actividad del polipéptido. Los factores que influyen en la optimización en codones incluyen uno o más de: (i) variación en los sesgos de codones entre dos o más organismos o genes o tablas de sesgo construidas sintéticamente, (ii) variación en el grado de sesgo de codones dentro de un organismo, gen, o conjunto de genes, (iii) variación sistemática de codones, lo que incluye el contexto, (iv) variación de codones de acuerdo con sus ARNt decodificantes, (v) variación de codones de acuerdo con % GC, ya sea en general o en una posición del triplete, (vi) variación en el grado de similitud con una secuencia de referencia, por ejemplo, una secuencia de origen natural, (vii) variación en el valor de corte de frecuencia de codones, (viii) propiedades estructurales de los ARNm transcritos a partir de la secuencia de ADN, (ix) conocimiento previo sobre la función de las secuencias de ADN en las que se va a basar el diseño del conjunto de sustituciones de codones, (x) variación sistemática de conjuntos de codones para cada aminoácido, y/o (xi) eliminación aislada de sitios de iniciación de la traducción espurios.

20 Como se usa en la presente, los términos "variante de polinucleótido" y "variante" y similares se refieren a polinucleótidos que muestran una identidad de secuencia sustancial con una secuencia de polinucleótidos de referencia o polinucleótidos que hibridan con una secuencia de referencia en condiciones rigurosas que se definen más adelante. Estos términos incluyen polinucleótidos en los que se han añadido o eliminado uno o más nucleótidos, o reemplazado con diferentes nucleótidos en comparación con un polinucleótido de referencia. Con respecto a esto, se entiende bien en la técnica que pueden realizarse ciertas alteraciones, lo que incluye mutaciones, adiciones, deleciones y sustituciones, a un polinucleótido de referencia, de manera que el polinucleótido alterado conserva la función o actividad biológica del polinucleótido de referencia.

30 Las variantes de polinucleótidos incluyen fragmentos de polinucleótidos que codifican fragmentos o variantes polipeptídicas biológicamente activas. Como se usa en la presente, el término "fragmento de polinucleótido" se refiere a un fragmento de polinucleótido de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 35 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700 o más nucleótidos de longitud que codifica una variante polipeptídica que conserva al menos 100 %, al menos 90 %, al menos 80 %, al menos 70 %, al menos 60 %, al menos 50 %, al menos 40 %, al menos 30 %, al menos 20 %, al menos 10 % o al menos 5 % de la actividad del polipéptido de origen natural. Fragmentos de polinucleótidos se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una deleción amino terminal, una deleción carboxilo terminal y/o una deleción o sustitución interna de uno o más aminoácidos de un polipéptido de origen natural o producido de manera recombinante.

40 Los enunciados "identidad de secuencia" o, por ejemplo, que comprenden una "secuencia 50 % idéntica a", como se usa en la presente, se refieren a la medida en que las secuencias son idénticas en una base nucleótido por nucleótido o una base aminoácido por aminoácido sobre una ventana de comparación. Por tanto, un "porcentaje de identidad de secuencia" puede calcularse al comparar dos secuencias alineadas óptimamente sobre la ventana de comparación, 45 determinar el número de posiciones en las que se produce la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, I) o el residuo de aminoácido idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividir el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicar el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. Se incluyen nucleótidos y polipéptidos que tienen al menos aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 86 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las secuencias de referencia descritas en la presente descripción, típicamente donde la 55 variante polipeptídica mantiene al menos una actividad biológica del polipéptido de referencia.

Los términos usados para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" tiene al menos 12 pero frecuentemente de 15 a 18 60 y con frecuencia al menos 25 unidades de monómeros, lo que incluye nucleótidos y residuos de aminoácidos, de longitud. Debido a que dos polinucleótidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (es decir, solo una porción de la secuencia completa del polinucleótido) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencia entre dos (o más) polinucleótidos se realizan típicamente comparando las secuencias de los dos polinucleótidos sobre una "ventana de comparación" para 65 identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencias. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, usualmente aproximadamente 50 a aproximadamente 100,

más usualmente aproximadamente 100 a aproximadamente 150, en la que una secuencia se compara con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alinean óptimamente. La ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, espacios) de aproximadamente 20 % o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El alineamiento óptimo de las secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse mediante implementaciones computarizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en la versión 7.0 del paquete de software Genetics de Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, Estados Unidos) o mediante inspección y el mejor alineamiento (es decir, que da como resultado el porcentaje de homología más alto sobre la ventana de comparación) generada mediante cualquiera de los diversos métodos seleccionados. También puede hacerse referencia a la familia de programas BLAST como, por ejemplo, se describe por Altschul y otros, 1997, Nucl. Acids Res. 25:3389. Una descripción detallada del análisis de secuencias puede encontrarse en la Unidad 19.3 de Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Capítulo 15.

Los términos que describen la orientación de los polinucleótidos incluyen: 5' (normalmente el extremo del polinucleótido que tiene un grupo fosfato libre) y 3' (normalmente el extremo del polinucleótido que tiene un grupo hidroxilo (OH) libre). Las secuencias de los polinucleótidos pueden anotarse en la orientación 5' a 3' o en la orientación 3' a 5'. Para el ADN y el ARNm, la hebra 5' a 3' se denomina hebra "sentido", "más" o "codificante" porque su secuencia es idéntica a la secuencia del mensajero (preARNm) [excepto por uracilo (U) en el ARN, en lugar de timina (T) en el ADN]. Para el ADN y el ARNm, la hebra complementaria 3' a 5' que es la hebra transcrita por la ARN polimerasa, se designa como hebra "plantilla", "antisentido", "menos" o "no codificante". Como se usa en la presente, el término "orientación inversa" se refiere a una secuencia 5' a 3' escrita en la orientación 3' a 5' o a una secuencia 3' a 5' escrita en la orientación 5' a 3'.

Los términos "complementario" y "complementariedad" se refieren a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las reglas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, la hebra complementaria de la secuencia de ADN 5' A G T C A T G 3' es 3' T C A G T A C 5'. La última secuencia se escribe con frecuencia como el complemento inverso con el extremo 5' a la izquierda y el extremo 3' a la derecha, 5' C A T G A C T 3'. Se dice que una secuencia que es igual a su complemento inverso es una secuencia palindrómica. La complementariedad puede ser "parcial", en la que solo algunas de las bases de ácidos nucleicos coinciden de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases. O, puede haber complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos.

Además, los expertos en la técnica apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, existen muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido, o fragmento de variante de este, como se describe en la presente descripción. Algunos de estos polinucleótidos portan una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. Sin embargo, los polinucleótidos que varían debido a las diferencias en el uso de codones se contemplan específicamente en modalidades particulares, por ejemplo, polinucleótidos que se optimizan para la selección de codones humanos y/o de primates. Además, también pueden usarse alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en la presente descripción. Los alelos son genes endógenos que se alteran como resultado de una o más mutaciones, tales como deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos.

El término "casete de ácido nucleico" o "casete de expresión", como se usa en la presente, se refiere a secuencias genéticas dentro del vector que pueden expresar un ARN, y subsecuentemente un polipéptido. En una modalidad, el casete de ácido nucleico contiene un(os) gen(es) de interés, por ejemplo, un(os) polinucleótido(s) de interés. En otra modalidad, el casete de ácido nucleico contiene una o más secuencias de control de la expresión, por ejemplo, un promotor, un potenciador, una secuencia poli(A), y un(os) gen(es) de interés, por ejemplo, un(os) polinucleótido(s) de interés. Los vectores pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más casetes de ácido nucleico. El casete de ácido nucleico se orienta posicional y secuencialmente dentro del vector de manera que el ácido nucleico en el casete puede transcribirse en ARN, y cuando sea necesario, traducirse en una proteína o un polipéptido, experimentar las modificaciones postraduccionales apropiadas requeridas para la actividad en la célula transformada, y translocarse al compartimiento apropiado para la actividad biológica al dirigirse a compartimientos intracelulares apropiados o secretarse en compartimientos extracelulares. Preferentemente, el casete tiene sus extremos 3' y 5' adaptados para la inserción fácil en un vector, por ejemplo, tiene sitios de endonucleasas de restricción en cada extremo. En una modalidad preferida, el casete de ácido nucleico contiene la secuencia de un receptor de antígeno quimérico usado para aumentar la citotoxicidad de las células cancerosas que expresan CD79A. El casete puede retirarse e insertarse en un plásmido o vector viral como una única unidad.

Polinucleótidos incluye el(los) polinucleótido(s) de interés. Como se usa en la presente, el término "polinucleótido de interés" se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido, variante polipeptídica, o polipéptido de fusión. Un vector puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 polinucleótidos de interés. En ciertas modalidades, el polinucleótido de interés codifica un polipéptido que proporciona un efecto terapéutico en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno. Los polinucleótidos de interés, y los polipéptidos codificados a partir de estos, incluyen tanto polinucleótidos que codifican polipéptidos de tipo silvestre, así como también variantes y fragmentos funcionales de estos. En modalidades particulares, una variante funcional tiene al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % de identidad con una secuencia polinucleotídica o polipeptídica de referencia de tipo silvestre

correspondiente. En ciertas modalidades, una variante o fragmento funcional tiene al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 % de una actividad biológica de un polipéptido de tipo silvestre correspondiente.

5 Los polinucleótidos contemplados en la presente descripción, independientemente de la longitud de la secuencia codificante en sí misma, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, tales como promotores y/o potenciadores, regiones no traducidas (UTR), secuencias señal, secuencias de Kozak, señales de poliadenilación, sitios adicionales de enzimas de restricción, sitios múltiples de clonación, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), sitios de reconocimiento de recombinasa (por ejemplo, LoxP, FRT, y sitios Att), codones de terminación, señales de terminación de la transcripción, y polinucleótidos que codifican polipéptidos autoescindibles, etiquetas de epítomos, como se describe en otra parte de la presente descripción o como se conoce en la técnica, de manera que su longitud total puede variar considerablemente. Por lo tanto, se contempla que puede emplearse un fragmento de polinucleótido de casi cualquier longitud en modalidades particulares, donde la longitud total está preferentemente limitada por la facilidad de preparación y el uso en el protocolo de ADN recombinante previsto.

15 Los polinucleótidos pueden prepararse, manipularse y/o expresarse mediante el uso de cualquiera de una variedad de técnicas bien establecidas conocidas y disponibles en la técnica. Para expresar un polipéptido deseado, puede insertarse una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en un vector apropiado.

20 Ejemplos ilustrativos de vectores incluyen plásmidos, secuencias de replicación autónoma y elementos transponibles, por ejemplo, piggyBac, Sleeping Beauty, Mos1, Tc1/mariner, Tol2, mini-Tol2, Tc3, MuA, Himar I, Frog Prince y derivados de estos.

25 Ejemplos ilustrativos adicionales de vectores incluyen, sin limitación, plásmidos, fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales tales como cromosoma artificial de levadura (YAC), cromosoma artificial bacteriano (BAC), o cromosoma artificial derivado de P1 (PAC), bacteriófagos tales como fago lambda o fago M13, y virus animales.

30 Ejemplos ilustrativos de virus útiles como vectores incluyen, sin limitación, retrovirus (lo que incluye lentivirus), adenovirus, virus adenoasociado, herpesvirus (por ejemplo, virus del herpes simple), poxvirus, baculovirus, papilomavirus y papovavirus (por ejemplo, SV40).

35 Ejemplos ilustrativos de vectores de expresión incluyen vectores pCIneo (Promega) para la expresión en células de mamíferos; pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ y pLenti6.2/V5-GW/lacZ (Invitrogen) para la transferencia y expresión génica mediada por lentivirus en células de mamíferos. En modalidades particulares, las secuencias codificantes de los polipéptidos descritos en la presente descripción pueden ligarse en dichos vectores de expresión para la expresión de los polipéptidos en células de mamíferos.

40 En modalidades particulares, el vector es un vector episomal o un vector que se mantiene extracromosomalmente. Como se usa en la presente, el término "episomal" se refiere a un vector que es capaz de replicarse sin integración en el ADN cromosomal del huésped y sin pérdida gradual de una célula huésped que se divide, lo que significa además que dicho vector se replica extracromosomal o episomalmente.

45 Los "elementos de control" o "secuencias reguladoras" presentes en un vector de expresión son aquellas regiones no traducidas del vector: origen de replicación, casetes de selección, promotores, potenciadores, señales de inicio de la traducción (secuencia de Shine Dalgarno o secuencia de Kozak), intrones, una secuencia de poliadenilación, regiones no traducidas 5' y 3', que interactúan con proteínas celulares del huésped para llevar a cabo la transcripción y traducción. Dichos elementos pueden variar en su fuerza y especificidad. En dependencia del sistema vectorial y del huésped utilizado, puede usarse cualquier número de elementos de transcripción y traducción adecuados, lo que incluye promotores ubicuos y promotores inducibles.

50 En modalidades particulares, los vectores, lo que incluye vectores de expresión y vectores virales, incluirán secuencias de control exógenas, endógenas o heterólogas tales como promotores y/o potenciadores. Una secuencia de control "endógena" es una que se enlaza naturalmente con un gen dado en el genoma. Una secuencia de control "exógena" es una que se coloca en yuxtaposición a un gen por medio de manipulación genética (es decir, técnicas de biología molecular) de manera que la transcripción de ese gen se dirige por el potenciador/promotor enlazado. Una secuencia de control "heteróloga" es una secuencia exógena que es de una especie diferente a la célula que se está manipulando genéticamente.

60 El término "promotor", como se usa en la presente, se refiere a un sitio de reconocimiento de un polinucleótido (ADN o ARN) al cual se une una ARN polimerasa. Una ARN polimerasa inicia y transcribe los polinucleótidos unidos operativamente al promotor. En modalidades particulares, los promotores operativos en células de mamíferos comprenden una región rica en AT ubicada aproximadamente 25 a 30 bases aguas arriba del sitio donde se inicia la transcripción y/u otra secuencia encontrada 70 a 80 bases aguas arriba desde el inicio de la transcripción, una región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido.

65 El término "potenciador" se refiere a un segmento de ADN que contiene secuencias capaces de proporcionar una

transcripción potenciada y en algunos casos puede funcionar independientemente de su orientación con relación a otra secuencia de control. Un potenciador puede funcionar cooperativamente o de manera aditiva con promotores y/u otros elementos potenciadores. El término "promotor/potenciador" se refiere a un segmento de ADN que contiene secuencias capaces de proporcionar tanto funciones promotoras como potenciadoras.

El término "unido operativamente" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. En una modalidad, el término se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de la expresión de ácido nucleico (tal como un promotor y/o un potenciador) y una segunda secuencia de polinucleótidos, por ejemplo, un polinucleótido de interés, en donde la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico que corresponde a la segunda secuencia.

Como se usa en la presente, el término "secuencia de control de la expresión constitutiva" se refiere a un promotor, potenciador, o promotor/potenciador que permite continuamente o de manera constante la transcripción de una secuencia unida operativamente. Una secuencia de control de la expresión constitutiva puede ser un promotor, potenciador o promotor/potenciador "ubícuo" que permite la expresión en una amplia variedad de tipos de células y tejidos o un promotor, potenciador o promotor/potenciador "específico de células", "específico de tipo de células", "específico de linaje celular" o "específico de tejidos" que permite la expresión en una variedad restringida de tipos de células y tejidos, respectivamente.

Las secuencias de control de la expresión ubicuas ilustrativas adecuadas para su uso en modalidades particulares incluyen un promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), un promotor de virus simio viral 40 (SV40) (por ejemplo, temprano o tardío), un promotor de LTR del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), una LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV), un promotor del virus del herpes simple (VHS) (timidina quinasa), promotores H5, P7.5, y P11 del virus de la vaccinia, un promotor del factor de elongación 1-alfa (EF1a), respuesta de crecimiento temprano 1 (EGR1), ferritina H (FerH), ferritina L (FerL), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), factor de iniciación de la traducción en eucariotas 4A1 (EIF4A1), proteína de choque térmico 5 de 70 kDa (HSPA5), proteína de choque térmico beta de 90 kDa, miembro 1 (HSP90B1), proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), β -cinesina (β -KIN), el locus ROSA 26 humano (Irions y otros, *Nature Biotechnology* 25, 1477 - 1482 (2007)), un promotor de ubiquitina C (UBC), un promotor de fosfoglicerato quinasa-1 (PGK), un potenciador de citomegalovirus/promotor de actina β de pollo (CAG), un promotor de β -actina y un promotor U3 del potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo, con región de control negativo eliminada, con sitio de unión al cebador dl587rev sustituido (MND) (Haas y otros, *Journal of Virology*. 2003;77(17): 9439-9450).

En una modalidad, un vector comprende un promotor de MNDU3.

En una modalidad, un vector comprende un promotor de EF1a que comprende el primer intrón del gen EF1a humano.

En una modalidad, un vector comprende un promotor de EF1a que carece del primer intrón del gen EF1a humano.

En una modalidad particular, puede ser conveniente expresar un polinucleótido que comprende un CAR a partir de un promotor específico de células T.

Como se usa en la presente, "expresión condicional" puede referirse a cualquier tipo de expresión condicional, lo que incluye expresión inducible; expresión reprimible; expresión en células o tejidos que tienen un estado fisiológico, biológico o de enfermedad particular, etc. Esta definición no pretende excluir la expresión específica de tipo de células o tejidos. Ciertas modalidades proporcionan la expresión condicional de un polinucleótido de interés, por ejemplo, la expresión se controla al someter una célula, tejido, organismo, etc., a un tratamiento o condición que provoca que se exprese el polinucleótido o que provoca un aumento o disminución en la expresión del polinucleótido codificado por el polinucleótido de interés.

Ejemplos ilustrativos de promotores/sistemas inducibles incluyen promotores inducibles por esteroides tales como promotores para genes que codifican receptores de glucocorticoides o estrógenos (inducibles mediante el tratamiento con la hormona correspondiente), promotor de metalotionina (inducible mediante tratamiento con diversos metales pesados), promotor de MX-1 (inducible por interferón), el sistema regulable de mifepristona "GeneSwitch" (Sirin y otros, 2003, *Gen*, 323:67), el cambio génico inducible por cumato (documento WO 2002/088346), sistemas reguladores dependientes de tetraciclina, etc.

La expresión condicional también puede lograrse mediante el uso de una ADN recombinasa específica de sitio. De acuerdo con ciertas modalidades, el vector comprende al menos uno(s) (típicamente dos) sitio(s) para la recombinación mediada por una recombinasa específica de sitio. Como se usa en la presente, los términos "recombinasa" o "recombinasa específica de sitio" incluyen proteínas de escisión o integrativas, enzimas, cofactores o proteínas asociadas que participan en reacciones de recombinación que implican uno o más sitios de recombinación (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, séptimo, diez, doce, quince, veinte, treinta, cincuenta, etc.), que pueden ser proteínas de tipo silvestre (ver Landy, *Current Opinion in Biotechnology* 3:699-707 (1993)), o mutantes, derivados (por ejemplo, proteínas de fusión que contienen las secuencias de recombinación o fragmentos de estas), fragmentos, y variantes de estos. Ejemplos ilustrativos de recombinasas adecuadas para su uso en modalidades

particulares incluyen: Cre, Int, IHF, Xis, Flp, Fis, Hin, Gin, Φ C31, Cin, Tn3 resolvasa, TndX, XerC, XerD, TnpX, Hjc, Gin, SpCCEI y ParA.

Los vectores pueden comprender uno o más sitios de recombinación para cualquiera de una amplia variedad de recombinasas específicas de sitio. Debe entenderse que el sitio objetivo para una recombinasa específica de sitio es además de cualquier sitio(s) requerido(s) para la integración de un vector, por ejemplo, un vector retroviral o un vector lentiviral. Como se usa en la presente, los términos "secuencia de recombinación", "sitio de recombinación" o "sitio de recombinación específica de sitio" se refieren a una secuencia de ácido nucleico particular a la que una recombinasa reconoce y se une.

Por ejemplo, un sitio de recombinación para la recombinasa Cre es loxP, que es una secuencia de 34 pares de bases que comprende dos repeticiones invertidas de 13 pares de bases (que sirven como los sitios de unión a la recombinasa) que flanquean una secuencia central de 8 pares de bases (ver la Figura 1 de Sauer, B., *Current Opinion in Biotechnology* 5:521-527 (1994)). Otros sitios loxP ilustrativos incluyen: lox511 (Hoess y otros, 1996; Bethke y Sauer, 1997), lox5171 (Lee y Saito, 1998), lox2272 (Lee y Saito, 1998), m2 (Langer y otros, 2002), lox71 (Albert y otros, 1995) y lox66 (Albert y otros, 1995).

Los sitios de reconocimiento adecuados para la recombinasa FLP incluyen: FRT (McLeod, y otros, 1996), F₁, F₂, F₃ (Schlake y Bode, 1994), F₄, F₅ (Schlake y Bode, 1994), FRT(LE) (Senecoff y otros, 1988), FRT(RE) (Senecoff y otros, 1988).

Otros ejemplos de secuencias de reconocimiento son las secuencias attB, attP, attL y attR, que son reconocidas por la enzima recombinasa λ integrasa, por ejemplo, phi-c31. El ϕ C31 SSR media la recombinación solo entre los sitios heterotípicos attB (34 pb de longitud) y attP (39 pb de longitud) (Groth y otros, 2000). attB y attP, denominados así por los sitios de unión para la integrasa de fagos en los genomas bacteriano y de fagos, respectivamente, contienen ambos repeticiones invertidas imperfectas que probablemente están unidas por homodímeros ϕ C31 (Groth y otros, 2000). Los sitios del producto, attL y attR, son efectivamente inertes a una recombinación adicional mediada por ϕ C31 (Belteki y otros, 2003), lo que hace que la reacción sea irreversible. Para catalizar inserciones, se ha descubierto que el ADN que porta attB se inserta en un sitio genómico attP más fácilmente que un sitio attP en un sitio genómico attB (Thyagarajan y otros, 2001; Belteki y otros, 2003). Por tanto, las estrategias típicas posicionan mediante recombinación homóloga un "sitio de acoplamiento" que porta attP en un locus definido, que después se asocia con una secuencia entrante que porta attB para la inserción.

Como se usa en la presente, un "sitio interno de entrada al ribosoma" o "IRES" se refiere a un elemento que promueve la entrada interna directa al ribosoma al codón de iniciación, tal como ATG, de un cistron (una región codificante de proteínas), lo que conduce de esta manera a la traducción independiente de la caperuza del gen. Ver, por ejemplo, Jackson y otros, 1990. *Trends Biochem Sci* 15(12):477-83) y Jackson y Kaminski. 1995. *RNA* 1(10):985-1000. En modalidades particulares, los vectores incluyen uno o más polinucleótidos de interés que codifican uno o más polipéptidos. En modalidades particulares, para lograr la traducción eficiente de cada uno de la pluralidad de polipéptidos, las secuencias de polinucleótidos pueden separarse mediante una o más secuencias de IRES o secuencias de polinucleótidos que codifican polipéptidos autoescindibles. En una modalidad, el IRES usado en los polinucleótidos contemplados en la presente descripción es un IRES de EMCV.

Como se usa en la presente, el término "secuencia de Kozak" se refiere a una secuencia de nucleótidos corta que facilita en gran medida la unión inicial del ARNm a la subunidad pequeña del ribosoma y aumenta la traducción. La secuencia de consenso de Kozak es (GCC)RCCATGG (SEQ ID NO: 75), donde R es una purina (A o G) (Kozak, 1986. *Cell*. 44(2):283-92, y Kozak, 1987. *Nucleic Acids Res.* 15(20):8125-48). En modalidades particulares, los vectores comprenden polinucleótidos que tienen una secuencia de consenso de Kozak y que codifican un polipéptido deseado, por ejemplo, un CAR.

Los elementos que dirigen la terminación y poliadenilación eficientes de los transcritos de ácido nucleico heterólogo aumentan la expresión del gen heterólogo. Las señales de terminación de la transcripción se encuentran generalmente aguas abajo de la señal de poliadenilación. En modalidades particulares, los vectores comprenden una secuencia de poliadenilación 3' de un polinucleótido que codifica un polipéptido a expresarse. El término "sitio poliA" o "secuencia poliA", como se usa en la presente, indica una secuencia de ADN que dirige tanto la terminación como la poliadenilación del transcrito de ARN naciente por la ARN polimerasa II. Las secuencias de poliadenilación pueden promover la estabilidad del ARNm mediante la adición de una cola de poliA al extremo 3' de la secuencia codificante y, por tanto, contribuir a un aumento de la eficiencia de traducción. La escisión y la poliadenilación se dirigen mediante una secuencia de poli(A) en el ARN. La secuencia de poli(A) central para los pre-ARNm de mamíferos tiene dos elementos de reconocimiento que flanquean un sitio de escisión-poliadenilación. Típicamente, un hexámero AAUAAA casi invariable se encuentra 20-50 nucleótidos aguas arriba de un elemento más variable rico en residuos U o GU. La escisión del transcrito naciente se produce entre estos dos elementos y se acopla a la adición de hasta 250 adenosinas al producto de escisión 5'. En modalidades particulares, la secuencia de poli(A) central es una secuencia de poliA ideal (por ejemplo, AATAAA, ATATAA, AGTAAA). En modalidades particulares, la secuencia de poli(A) es una secuencia de poliA de SV40, una secuencia de poliA de hormona de crecimiento bovina (BGHPA), una secuencia de poliA de β -globina de conejo (r β gpA), variantes de estas, u otra secuencia de poliA endógena o heteróloga adecuada conocida

en la técnica.

En algunas modalidades, un polinucleótido o célula que alberga el polinucleótido utiliza un gen suicida, lo que incluye un gen suicida inducible para reducir el riesgo de toxicidad directa y/o proliferación no controlada. En aspectos específicos, el gen suicida no es inmunogénico para el huésped que alberga el polinucleótido o la célula. Un cierto ejemplo de un gen suicida que puede usarse es caspasa-9 o caspasa-8 o citosina desaminasa. La caspasa-9 puede activarse mediante el uso de un inductor químico específico de dimerización (CID).

En modalidades particulares, uno o más polinucleótidos que codifican un CAR anti-CD79A se introducen en una célula (por ejemplo, una célula efectora inmunitaria) mediante vectores virales o no virales.

El término "vector" se usa en la presente descripción para referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transferir o transportar otra molécula de ácido nucleico. El ácido nucleico transferido se une generalmente, por ejemplo, se inserta, en la molécula de ácido nucleico del vector. Un vector puede incluir secuencias que dirigen la replicación autónoma en una célula, o puede incluir secuencias suficientes para permitir la integración en el ADN de la célula huésped. En modalidades particulares, se usan vectores no virales para suministrar uno o más polinucleótidos contemplados en la presente descripción a una célula T. En una modalidad, el vector es un ARNm sintetizado in vitro o preparado sintéticamente que codifica un CAR anti-CD79A.

Ejemplos ilustrativos de vectores no virales incluyen ARNm, plásmidos (por ejemplo, plásmidos de ADN o plásmidos de ARN), transposones, cósmidos y cromosomas bacterianos artificiales.

Los métodos ilustrativos para el suministro no viral de polinucleótidos contemplados en modalidades particulares incluyen: electroporación, sonoporación, lipofección, microinyección, biolística, virosomas, liposomas, inmunoliposomas, nanopartículas, poliación o conjugados lípido:ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales, transferencia mediada por DEAE-dextrano, pistola génica y choque térmico.

Ejemplos ilustrativos de sistemas de suministro de polinucleótidos adecuados para su uso en modalidades particulares contempladas en modalidades particulares incluyen los proporcionados por Amaxa Biosystems, Maxcyte, Inc., BTX Molecular Delivery Systems y Copernicus Therapeutics Inc. Los reactivos de lipofección se venden comercialmente (por ejemplo, Transfectam™ y Lipofectin™). Lípidos catiónicos y neutros que son adecuados para la lipofección eficiente de polinucleótidos por reconocimiento de receptor se han descrito en la literatura. Ver, por ejemplo, Liu y otros (2003) Gene Therapy. 10:180-187; y Balazs y otros (2011) Journal of Drug Delivery. 2011:1-12. El suministro basado en nanocélulas no vivas de origen bacteriano y dirigido a anticuerpos, también se contempla en modalidades particulares.

En diversas modalidades, el polinucleótido es un ARNm que se introduce en una célula para expresar transitoriamente un polipéptido deseado. Como se usa en la presente, "transitoria" se refiere a la expresión de un transgén no integrado durante un período de horas, días o semanas, en donde el período de tiempo de expresión es menor que el período de tiempo para la expresión del polinucleótido si se integrara en el genoma o estuviera contenido dentro de un replicón de plásmido estable en la célula.

En modalidades particulares, el ARNm que codifica un polipéptido es un ARNm transcrito in vitro. Como se usa en la presente, "ARN transcrito in vitro" se refiere a ARN, preferentemente ARNm, que se ha sintetizado in vitro. Generalmente, el ARN transcrito in vitro se genera a partir de un vector de transcripción in vitro. El vector de transcripción in vitro comprende una plantilla que se usa para generar el ARN transcrito in vitro.

En modalidades particulares, los ARNm pueden comprender además una caperuza 5' o una caperuza 5' modificada y/o una secuencia de poli(A). Como se usa en la presente, una caperuza 5' (también denominada caperuza de ARN, caperuza de ARN 7-metilguanosa o caperuza de ARN m^{7G}) es un nucleótido de guanina modificado que se ha añadido al "frente" o extremo 5' de un ARN mensajero eucariota poco después del inicio de la transcripción. La caperuza 5' comprende un grupo terminal que se une al primer nucleótido transcrito y reconocido por el ribosoma y protege de las ARNasas. El resto de recubrimiento puede modificarse para modular la funcionalidad del ARNm tal como su estabilidad o eficiencia de la traducción. En una modalidad particular, el ARNm comprende una secuencia de poli(A) de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 5000 adeninas. En una modalidad, el ARNm comprende una secuencia de poli(A) de entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1000 bases, entre aproximadamente 200 y aproximadamente 500 bases, o entre aproximadamente 300 y aproximadamente 400 bases. En una modalidad, el ARNm comprende una secuencia de poli(A) de aproximadamente 65 bases, aproximadamente 100 bases, aproximadamente 200 bases, aproximadamente 300 bases, aproximadamente 400 bases, aproximadamente 500 bases, aproximadamente 600 bases, aproximadamente 700 bases, aproximadamente 800 bases, aproximadamente 900 bases, o aproximadamente 1000 o más bases. Las secuencias de poli(A) pueden modificarse química o enzimáticamente para modular la funcionalidad del ARNm, tal como la localización, la estabilidad o la eficiencia de la traducción.

Los vectores virales que comprenden polinucleótidos contemplados en modalidades particulares pueden suministrarse in vivo mediante la administración a un paciente individual, típicamente mediante administración sistémica (por ejemplo, infusión intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subdérmica o intracraneal) o aplicación tópica, como se

describe más abajo. Alternativamente, los vectores pueden suministrarse a células ex vivo, tales como células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, sangre periférica movilizada, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia de tejido, etc.) o células madre hematopoyéticas universales del donante, seguido del reimplante de las células en un paciente.

5 En una modalidad, un vector viral que comprende un polinucleótido que codifica un CAR anti-CD79A se administra directamente a un organismo para la transducción de las células in vivo. Alternativamente, puede administrarse ADN desnudo. La administración se realiza por cualquiera de las vías usadas normalmente para introducir una molécula hacia el contacto final con células sanguíneas o tisulares, lo que incluye inyección, infusión, aplicación tópica y electroporación. Los métodos adecuados para administrar dichos ácidos nucleicos están disponibles y son bien conocidos por los expertos en la técnica, y, aunque puede usarse más de una vía para administrar una composición en particular, una vía en particular puede proporcionar con frecuencia una reacción más inmediata y más efectiva que otra vía.

15 Ejemplos ilustrativos de sistemas de vectores virales adecuados para su uso en modalidades particulares contempladas en la presente descripción incluyen vectores de virus adenoasociados (AAV), retrovirus, virus del herpes simple, adenovirus y del virus de la vaccinia.

20 En diversas modalidades, uno o más polinucleótidos que codifican un CAR anti-CD79A se introducen en una célula efectora inmunitaria, por ejemplo, una célula T, al transducir la célula con un virus adenoasociado recombinante (rAAV), que comprende el uno o más polinucleótidos.

25 El AAV es un virus pequeño (~26 nm) no envuelto, defectuoso para la replicación, principalmente episomal. El AAV puede infectar tanto células que se dividen como las que no se dividen y puede incorporar su genoma en el de la célula huésped. El AAV recombinante (AAVr) se compone típicamente de, como mínimo, un transgén y sus secuencias reguladoras, y repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV 5' y 3'. Las secuencias ITR tienen aproximadamente 145 pb de longitud. En modalidades particulares, el rAAV comprende ITR y secuencias de la cápside aisladas de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 o AAV10.

30 En algunas modalidades, se usa un rAAV quimérico, las secuencias ITR se aíslan de un serotipo de AAV y las secuencias de la cápside se aíslan de un serotipo de AAV diferente. Por ejemplo, un rAAV con secuencias ITR derivadas de AAV2 y secuencias de la cápside derivadas de AAV6 se denomina AAV2/AAV6. En modalidades particulares, el vector de rAAV puede comprender ITR de AAV2 y proteínas de la cápside de uno cualquiera de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 o AAV10. En una modalidad preferida, el rAAV comprende secuencias ITR derivadas de AAV2 y secuencias de la cápside derivadas de AAV6. En una modalidad preferida, el rAAV comprende secuencias ITR derivadas de AAV2 y secuencias de la cápside derivadas de AAV2.

35 En algunas modalidades, pueden aplicarse métodos de manipulación genética y selección a las cápsides de AAV para hacerlas más propensas a transducir las células de interés.

40 La construcción de vectores de rAAV, la producción y la purificación de estos se han descrito, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos núms. 9,169,494; 9,169,492; 9,012,224; 8,889,641; 8,809,058; y 8,784,799.

45 En diversas modalidades, uno o más polinucleótidos que codifican un CAR anti-CD79A se introducen en una célula efectora inmunitaria, al transducir la célula con un retrovirus, por ejemplo, un lentivirus, que comprende el uno o más polinucleótidos.

50 Como se usa en la presente, el término "retrovirus" se refiere a un virus de ARN que transcribe inversamente su ARN genómico en una copia de ADN bicatenario lineal y subsecuentemente integra covalentemente su ADN genómico en un genoma huésped. Retrovirus ilustrativos adecuados para su uso en modalidades particulares incluyen: virus de la leucemia murina de Moloney (M-MuLV), virus del sarcoma murino de Moloney (MoMSV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV), virus de la leucemia del gibón (GaLV), virus de la leucemia felina (FLV), espumavirus, virus de la leucemia murina de Friend, virus de las células madre murinas (MSCV) y virus del sarcoma de Rous (RSV) y lentivirus.

55 Como se usa en la presente, el término "lentivirus" se refiere a un grupo (o género) de retrovirus complejos. Lentivirus ilustrativos incluyen: VIH (virus de la inmunodeficiencia humana; lo que incluye VIH tipo 1 y VIH 2); virus de visna-maedi (VMV); virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV); virus de la anemia infecciosa equina (EIAV); virus de la inmunodeficiencia felina (FIV); virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV); y virus de la inmunodeficiencia en simios (SIV). En una modalidad, se prefieren las cadenas principales de vectores basadas en VIH (es decir, elementos de secuencia que actúan en cis del VIH).

60 En diversas modalidades, un vector lentiviral contemplado en la presente descripción comprende una o más LTR, y uno o más, o todos, los siguientes elementos accesorios: un cPPT/FLAP, una señal de empaque Psi (ψ), un elemento de exportación, secuencias de poli(A), y puede comprender opcionalmente un WPRE o HPRE, un elemento aislante, un marcador de selección y un gen de suicidio celular, como se analiza en otra parte en la presente descripción.

En modalidades particulares, los vectores lentivirales contemplados en la presente descripción pueden ser lentivirus integrativos o no integrativos o defectuosos para la integración. Como se usa en la presente, el término "lentivirus defectuoso para la integración" o "IDLV" se refiere a un lentivirus que tiene una integrasa que carece de la capacidad de integrar el genoma viral en el genoma de las células huésped. Vectores virales incompetentes para la integración se han descrito en la solicitud de patente WO 2006/010834.

Mutaciones ilustrativas en el gen pol del VIH-1 adecuadas para reducir la actividad integrasa incluyen: H12N, H12C, H16C, H16V, S81 R, D41A, K42A, H51A, Q53C, D55V, D64E, D64V, E69A, K71A, E85A, E87A, D116N, D116I, D116A, N120G, N120I, N120E, E152G, E152A, D35E, K156E, K156A, E157A, K159E, K159A, K160A, R166A, D167A, E170A, H171A, K173A, K186Q, K186T, K188T, E198A, R199c, R199T, R199A, D202A, K211A, Q214L, Q216L, Q221 L, W235F, W235E, K236S, K236A, K246A, G247W, D253A, R262A, R263A y K264H.

En una modalidad, el gen pol deficiente en integrasa del VIH-1 comprende una mutación D64V, D116I, D116A, E152G o E152A; las mutaciones D64V, D116I y E152G; o las mutaciones D64V, D116A y E152A.

En una modalidad, el gen pol deficiente en integrasa del VIH-1 comprende una mutación D64V.

El término "repetición terminal larga (LTR)" se refiere a dominios de pares de bases ubicados en los extremos de ADN retrovirales que, en su contexto de secuencia natural, son repeticiones directas y contienen regiones U3, R y U5.

Como se usa en la presente, el término "elemento FLAP" o "cPPT/FLAP" se refiere a un ácido nucleico cuya secuencia incluye el tracto de polipurina central y secuencias centrales de terminación (cPPT y CTS) de un retrovirus, por ejemplo, VIH-1 o VIH-2. Elementos FLAP adecuados se describen en la patente de Estados Unidos núm. 6,682,907 y en Zennou, y otros, 2000, Cell, 101: 173. En otra modalidad, un vector lentiviral contiene un elemento FLAP con una o más mutaciones en los elementos cPPT y/o CTS. En aún otra modalidad, un vector lentiviral comprende un elemento cPPT o un elemento CTS. En aún otra modalidad, un vector lentiviral no comprende un elemento cPPT o un elemento CTS.

Como se usa en la presente, el término "señal de empaque" o "secuencia de empaque" se refiere a secuencias psi [ψ] ubicadas dentro del genoma retroviral requeridas para la inserción del ARN viral en la cápside o partícula viral, ver por ejemplo, Clever y otros, 1995. J. of Virology, vol. 69, núm. 4; págs. 2101-2109.

El término "elemento de exportación" se refiere a un elemento regulador postranscripcional que actúa en cis que regula el transporte de un transcrito de ARN desde el núcleo hasta el citoplasma de una célula. Los ejemplos de elementos de exportación de ARN incluyen el elemento de respuesta a rev (RRE) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (ver, por ejemplo, Cullen y otros, 1991. J. Virol. 65: 1053; y Cullen y otros, 1991. Cell 58: 423) y el elemento regulador postranscripcional (HPRE) del virus de la hepatitis B.

En modalidades particulares, la expresión de secuencias heterólogas en vectores virales se aumenta al incorporar en los vectores elementos reguladores postranscripcionales, sitios de poliadenilación eficientes y, opcionalmente, señales de terminación de la transcripción. Una variedad de elementos reguladores postranscripcionales puede aumentar la expresión de un ácido nucleico heterólogo en la proteína, por ejemplo, un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE; Zufferey y otros, 1999, J. Virol., 73:2886); el elemento regulador postranscripcional presente en el virus de la hepatitis B (HPRE) (Huang y otros, Mol. Cell. Biol., 5:3864); y similares (Liu y otros, 1995, Genes Dev., 9:1766).

Los vectores lentivirales contienen, preferentemente, varias mejoras de seguridad como resultado de modificar las LTR. Vectores "autoinactivables" (SIN) se refiere a vectores defectuosos para la replicación, por ejemplo, en los que la región potenciadora-promotora (3') de la LTR derecha, conocida como la región U3, se ha modificado (por ejemplo, mediante delección o sustitución) para evitar la transcripción viral más allá de la primera ronda de replicación viral. Se proporciona una mejora adicional de la seguridad al reemplazar la región U3 de la LTR 5' con un promotor heterólogo para impulsar la transcripción del genoma viral durante la producción de partículas virales. Los ejemplos de promotores heterólogos que pueden usarse incluyen, por ejemplo, promotores del virus del simio viral 40 (SV40) (por ejemplo, temprano o tardío), de citomegalovirus (CMV) (por ejemplo, inmediato temprano), del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), del virus del sarcoma de Rous (RSV) y del virus del herpes simple (HSV) (timidina quinasa).

Los términos "pseudotipo" o "pseudotipado", como se usan en la presente, se refieren a un virus que tiene proteínas de la envoltura viral que se han sustituido con las de otro virus que posee características preferibles. Por ejemplo, el VIH puede pseudotiparse con proteínas de la envoltura de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), lo que permite que el VIH infecte una gama más amplia de células porque las proteínas de la envoltura del VIH (codificadas por el gen env) dirigen normalmente el virus a las células que presentan CD4⁺.

En ciertas modalidades, los vectores lentivirales se producen de acuerdo con métodos conocidos. Ver, por ejemplo, Kutner y otros, BMC Biotechnol. 2009;9:10. doi: 10.1186/1472-6750-9-10; Kutner y otros, Nat. Protoc. 2009;4(4):495-505. doi: 10.1038/nprot.2009.22.

De acuerdo con ciertas modalidades específicas contempladas en la presente descripción, la mayoría o todas las secuencias de la cadena principal del vector viral se derivan de un lentivirus, por ejemplo, VIH-1. Sin embargo, debe entenderse que pueden usarse muchas fuentes diferentes de secuencias retrovirales y/o lentivirales, o combinarse y pueden acomodarse numerosas sustituciones y alteraciones en ciertas de las secuencias lentivirales sin afectar la capacidad de un vector de transferencia para realizar las funciones descritas en la presente descripción. Además, se conocen en la técnica una variedad de vectores lentivirales, ver Naldini y otros, (1996a, 1996b y 1998); Zufferey y otros, (1997); Dull y otros, 1998, patentes de Estados Unidos núms. 6,013,516; y 5,994,136, muchos de los cuales pueden adaptarse para producir un vector viral o plásmido de transferencia contemplado en la presente descripción.

En diversas modalidades, se introducen en una célula efectora inmunitaria uno o más polinucleótidos que codifican un CAR anti-CD79A al transducir la célula con un adenovirus que comprende el uno o más polinucleótidos.

Los vectores basados en adenovirus son capaces de lograr una eficiencia de transducción muy alta en muchos tipos de células y no requieren división celular. Con dichos vectores, se han obtenido altos títulos y altos niveles de expresión. Este vector puede producirse en grandes cantidades en un sistema relativamente simple. La mayoría de los vectores de adenovirus se manipulan de manera que un transgén reemplaza los genes Ad E1a, E1b y/o E3; subsecuentemente, el vector defectuoso para la replicación se propaga en células 293 humanas que suministran la función génica eliminada en trans. Los vectores Ad pueden transducir múltiples tipos de tejidos in vivo, lo que incluyen células diferenciadas que no se dividen, tales como las que se encuentran en hígado, riñón y músculo. Los vectores Ad convencionales tienen una gran capacidad de transporte.

La generación y propagación de los vectores de adenovirus actuales, que son deficientes para la replicación, puede utilizar una línea celular auxiliar única, denominada 293, que se transformó a partir de células renales embrionarias humanas mediante fragmentos de ADN de Ad5 y expresa constitutivamente proteínas E1 (Graham y otros, 1977). Dado que la región E3 es prescindible del genoma del adenovirus (Jones y Shenk, 1978), los vectores de adenovirus actuales, con la ayuda de células 293, portan ADN extraño ya sea en las regiones E1 o D3 o en ambas regiones (Graham y Prevec, 1991). Los vectores de adenovirus se han usado en la expresión de genes en eucariotas (Levrero y otros, 1991; Gomez-Foix y otros, 1992) y en el desarrollo de vacunas (Grunhaus y Horwitz, 1992; Graham y Prevec, 1992). Los estudios en la administración de adenovirus recombinante a diferentes tejidos incluyen la instilación en la tráquea (Rosenfeld y otros, 1991; Rosenfeld y otros, 1992), la inyección en músculo (Ragot y otros, 1993), las inyecciones intravenosas periféricas (Herz y Gerard, 1993) y la inoculación estereotáxica en el cerebro (Le Gal La Salle y otros, 1993). Un ejemplo del uso de un vector Ad en un ensayo clínico implicó la terapia con polinucleótidos para la inmunización antitumoral con inyección intramuscular (Stermán y otros, Hum. Gene Ther. 7: 1083-9 (1998)).

En diversas modalidades, uno o más polinucleótidos que codifican un CAR anti-CD79A se introducen en una célula efectora inmunitaria al transducir la célula con un virus del herpes simple, por ejemplo, HSV-1, HSV-2, que comprende el uno o más polinucleótidos.

El virión del VHS maduro consiste en una cápside icosaédrica envuelta con un genoma viral que consiste de una molécula de ADN lineal bicatenario que tiene 152 kb. En una modalidad, el vector viral basado en HSV es deficiente en uno o más genes de HSV esenciales o no esenciales. En una modalidad, el vector viral basado en HSV es deficiente para la replicación. La mayoría de los vectores de HSV deficientes para la replicación contienen una delección para eliminar uno o más genes de HSV tempranos-inmediatos, tempranos o tardíos para impedir la replicación. Por ejemplo, el vector de HSV puede ser deficiente en un gen temprano inmediato seleccionado del grupo que consiste en ICP4, ICP22, ICP27, ICP47, y sus combinaciones. Las ventajas del vector de HSV son su capacidad para entrar en una etapa latente que puede dar como resultado la expresión de ADN a largo plazo y su gran genoma de ADN viral que puede acomodar insertos de ADN exógeno de hasta 25 kb. Los vectores basados en HSV se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núms. 5,837,532, 5,846,782 y 5,804,413, y las solicitudes de patente internacional WO 91/02788, WO 96/04394, WO 98/15637 y WO 99/06583.

F. Células modificadas genéticamente

En diversas modalidades, se proporcionan células modificadas genéticamente para expresar los CAR contemplados en la presente descripción, para su uso en el tratamiento del cáncer. Como se usa en la presente, el término "manipulada genéticamente" o "modificada genéticamente" se refiere a la adición de material genético adicional en forma de ADN o ARN en el material genético total en una célula. Los términos "células modificadas genéticamente", "células modificadas" y "células redirigidas", se usan indistintamente. Como se usa en la presente, el término "terapia génica" se refiere a la introducción de material genético adicional en forma de ADN o ARN en el material genético total en una célula que restaura, corrige o modifica la expresión de un gen, o con el propósito de expresar un polipéptido terapéutico, por ejemplo, un CAR.

En modalidades particulares, los CAR anti-CD79A contemplados en la presente descripción se introducen y expresan en células efectoras inmunitarias para redirigir su especificidad hacia un antígeno objetivo de interés, por ejemplo, un polipéptido CD79A. Una "célula efectora inmunitaria" es cualquier célula del sistema inmunitario que tiene una o más funciones efectoras (por ejemplo, actividad de destrucción de células citotóxicas, secreción de citocinas, inducción de ADCC y/o CDC). Las células efectoras inmunitarias ilustrativas contempladas en la presente descripción son linfocitos

T, lo que incluye células T citotóxicas (CTL; células T CD8⁺), TIL y células T cooperadoras (HTL; células T CD4⁺. En una modalidad particular, las células comprenden células T $\alpha\beta$. En una modalidad particular, las células comprenden células T $\gamma\delta$. En una modalidad, las células efectoras inmunitarias incluyen células asesinas naturales (NK). En una modalidad, las células efectoras inmunitarias incluyen células T asesinas naturales (NKT).

Las células efectoras inmunitarias pueden ser autólogas/autogénicas ("propias") o no autólogas ("no propias", por ejemplo, alogénicas, singénicas o xenogénicas). "Autóloga", como se usa en la presente, se refiere a células del mismo sujeto. "Alogénica", como se usa en la presente, se refiere a células de la misma especie que difieren genéticamente de la célula en comparación. "Singénica", como se usa en la presente, se refiere a células de un sujeto diferente que son genéticamente idénticas a la célula en comparación. "Xenogénica", como se usa en la presente, se refiere a células de una especie diferente a la célula en comparación. En modalidades preferidas, las células son alogénicas.

Las células efectoras inmunitarias ilustrativas usadas con los CAR anti-CD79A contemplados en modalidades particulares incluyen los linfocitos T. Los términos "célula T" o "linfocito T" son reconocidos en la técnica y pretenden incluir timocitos, linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros, linfocitos T en reposo o linfocitos T activados. Una célula T puede ser una célula T cooperadora (Th), por ejemplo, una célula T cooperadora 1 (Th1) o una célula T cooperadora 2 (Th2). La célula T puede ser una célula T cooperador (HTL; célula T CD4⁺) célula T CD4⁺, una célula T citotóxica (CTL; célula T CD8⁺), célula T CD4⁺CD8⁺, célula T CD4⁺CD8⁻ o cualquier otro subconjunto de células T. Otras poblaciones ilustrativas de células T adecuadas para su uso en modalidades particulares incluyen células T vírgenes (T_N), células madre T de memoria (T_{SCM}), células T de memoria central (T_{CM}), células T de memoria efectoras (T_{EM}) y células T efectoras (T_{EFF}).

Como entenderá el experto en la técnica, también pueden usarse otras células como células efectoras inmunitarias con los CAR anti-CD79A contemplados en la presente descripción. En particular, las células efectoras inmunitarias también incluyen células NK, células NKT, neutrófilos y macrófagos. Las células efectoras inmunitarias también incluyen las progenitoras de las células efectoras, en donde dichas células progenitoras pueden inducirse a diferenciarse en células efectoras inmunitarias in vivo o in vitro. Por tanto, en modalidades particulares, la célula efectora inmunitaria incluye las progenitoras de células efectoras inmunitarias tales como células madre hematopoyéticas (HSC) contenidas dentro de la población de células CD34⁺ derivadas de sangre del cordón umbilical, médula ósea o sangre periférica movilizada que, tras la administración en un sujeto, se diferencian en células efectoras inmunitarias maduras, o que pueden inducirse in vitro a diferenciarse en células efectoras inmunitarias maduras.

Como se usa en la presente, las células efectoras inmunitarias manipuladas genéticamente para contener un CAR específico de CD79A pueden denominarse como "células efectoras inmunitarias redirigidas específicas de CD79A".

El término "célula CD34⁺", como se usa en la presente, se refiere a una célula que expresa la proteína CD34 en su superficie celular. "CD34⁺", como se usa en la presente, se refiere a una glicoproteína de la superficie celular (por ejemplo, proteína sialomucina) que con frecuencia actúa como un factor de adhesión célula-célula y está implicada en la entrada de las células T en los ganglios linfáticos. La población de células CD34⁺ contiene células madre hematopoyéticas (HSC) que, tras la administración a un paciente, se diferencian y contribuyen a todos los linajes hematopoyéticos, lo que incluye células T, células NK, células NKT, neutrófilos y células del linaje de monocitos/macrófagos.

En modalidades particulares, se proporcionan métodos para generar las células efectoras inmunitarias que expresan un CAR anti-CD79A contemplado en la presente descripción. En una modalidad, el método comprende transfectar o transducir células efectoras inmunitarias aisladas de un individuo, de manera que las células efectoras inmunitarias expresen uno o más CAR anti-CD79A contemplados en la presente descripción. En ciertas modalidades, las células efectoras inmunitarias se aíslan de un individuo y se modifican genéticamente sin manipulación adicional in vitro. Dichas células pueden entonces volver a administrarse directamente al individuo. En modalidades adicionales, las células efectoras inmunitarias primero se activan y se estimulan a proliferar in vitro antes de modificarse genéticamente para expresar un CAR anti-CD79A. Con respecto a esto, las células efectoras inmunitarias pueden cultivarse antes y/o después de modificarse genéticamente (es decir, transducirse o transfectarse para expresar un CAR anti-CD79A contemplado en la presente descripción).

En modalidades particulares, antes de la manipulación o la modificación genética in vitro de las células efectoras inmunitarias descritas en la presente descripción, se obtiene la fuente de células de un sujeto. En modalidades particulares, las células efectoras inmunitarias modificadas con CAR comprenden células T.

En modalidades particulares, las PBMC pueden modificarse genéticamente directamente para expresar CAR anti-CD79A mediante el uso de métodos contemplados en la presente descripción. En ciertas modalidades, después del aislamiento de las PBMC, los linfocitos T se aíslan adicionalmente y en ciertas modalidades, tanto los linfocitos T citotóxicos como los cooperadores pueden clasificarse en subpoblaciones de células T vírgenes, de memoria y efectoras ya sea antes o después de la modificación genética y/o la expansión.

Las células efectoras inmunitarias, tales como las células T, pueden modificarse genéticamente después del aislamiento mediante el uso de métodos conocidos, o las células efectoras inmunitarias pueden activarse y expandirse

(o diferenciarse en el caso de las progenitoras) in vitro antes de modificarse genéticamente. En una modalidad particular, las células efectoras inmunitarias, tales como las células T, se modifican genéticamente con los receptores de antígenos quiméricos contemplados en la presente descripción (por ejemplo, se transducen con un vector viral que comprende un ácido nucleico que codifica un CAR anti-CD79A) y después se activan y se expanden in vitro. En

diversas modalidades, las células T pueden activarse y expandirse antes o después de la modificación genética para expresar un CAR, mediante el uso de métodos como se describió, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7, 172,869; 7,232,566; 7, 175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; y la publicación de solicitud de patente núm. 20060121005.

En una modalidad, las células CD34⁺ se transducen con un constructo de ácido nucleico contemplado en la presente descripción. En ciertas modalidades, las células CD34⁺ transducidas se diferencian en células efectoras inmunitarias maduras in vivo después de la administración en un sujeto, generalmente, el sujeto a partir del cual se aislaron originalmente las células. En otra modalidad, las células CD34⁺ pueden estimularse in vitro antes de la exposición o después de modificarse genéticamente con un CAR como se describe en la presente descripción, con una o más de las siguientes citocinas: ligando Flt-3 (FLT3), factor de células madre (SCF), factor de diferenciación y crecimiento de megacariocitos (TPO), IL-3 e IL-6, de acuerdo con los métodos descritos anteriormente (Asheuer y otros, 2004; Imren, y otros, 2004).

En modalidades particulares, una población de células efectoras inmunitarias modificadas para el tratamiento del cáncer comprenden un CAR como se contempla en la presente descripción. Por ejemplo, se prepara una población de células efectoras inmunitarias modificadas a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de un paciente diagnosticado con neoplasia maligna de células B descrita en la presente descripción (donantes autólogos). Las PBMC forman una población heterogénea de linfocitos T que pueden ser CD4⁺, CD8⁺ o CD4⁺ y CD8⁺.

Las PBMC también pueden incluir otros linfocitos citotóxicos tales como las células NK o las células NKT. Un vector de expresión que porta la secuencia codificante de un CAR contemplado en modalidades particulares se introduce en una población de células T, células NK o células NKT de un donante humano. En modalidades particulares, las células T transducidas exitosamente que portan el vector de expresión pueden clasificarse mediante el uso de citometría de flujo para aislar células T positivas a CD3 y después propagarse adicionalmente para aumentar el número de células T que expresan la proteína CAR, además de la activación celular mediante el uso de anticuerpos anti-CD3 y/o anticuerpos anti-CD28 e IL-2 o cualquier otro método conocido en la técnica como se describe en otra parte en la presente descripción. Se usan procedimientos estándar para la crioconservación de las células T que expresan las células T con proteína CAR para su almacenamiento y/o preparación para su uso en un sujeto humano. En una modalidad, la transducción, cultivo y/o expansión in vitro de las células T se realiza en ausencia de productos derivados de animales no humanos, tales como suero fetal de ternera y suero fetal bovino. Dado que se modifica genéticamente una población heterogénea de PBMC, las células transducidas resultantes son una población heterogénea de células modificadas que comprenden un CAR anti-CD79A como se contempla en la presente descripción.

En una modalidad adicional, puede usarse una mezcla de, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco o más vectores de expresión diferentes en la modificación genética de una población de células efectoras inmunitarias del donante, en donde cada vector codifica una proteína receptor de antígeno quimérico diferente como se contempla en la presente descripción. Las células efectoras inmunitarias modificadas resultantes forman una población mixta de células modificadas, con una proporción de las células modificadas que expresan más de una proteína CAR diferente.

G. Métodos de fabricación de células t

En diversas modalidades, las células T modificadas genéticamente se expanden mediante el contacto con un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3 TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de las células T.

En modalidades particulares, las PBMC o células T aisladas se ponen en contacto con un agente estimulador y un agente coestimulador, tales como anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 solubles, o anticuerpos unidos a una perla u otra superficie, en un medio de cultivo con citocinas adecuadas, tales como IL-2, IL-7 y/o IL-15.

En modalidades particulares, las PBMC o células T aisladas se ponen en contacto con un agente estimulador y un agente coestimulador, tales como anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 solubles, o anticuerpos unidos a una perla u otra superficie, en un medio de cultivo con citocinas adecuadas, tales como IL-2, IL-7 y/o IL-15 y/o uno o más agentes que modulan una vía de señalización celular PI3K/Akt/mTOR.

En modalidades preferidas, las células T fabricadas mediante los métodos contemplados en la presente descripción proporcionan composiciones para inmunoterapia adoptiva mejoradas. Sin desear limitarse a ninguna teoría en particular, se cree que las composiciones de células T generadas mediante los métodos en modalidades particulares contempladas en la presente descripción están impregnadas de propiedades superiores, lo que incluye mayor supervivencia, expansión en la ausencia relativa de diferenciación, y persistencia in vivo. En una modalidad, un método

para fabricar células T comprende poner en contacto las células con uno o más agentes que modulan una vía de señalización celular PI3K. En una modalidad, un método para fabricar células T comprende poner en contacto las células con uno o más agentes que modulan una vía de señalización celular PI3K/Akt/mTOR. En diversas modalidades, las células T pueden obtenerse de cualquier fuente y ponerse en contacto con el agente durante las fases de activación y/o expansión del proceso de fabricación. Las composiciones de células T resultantes están enriquecidas en células T potentes para el desarrollo que tienen la capacidad de proliferar y expresar uno o más de los siguientes biomarcadores: CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197, CD38 y CD8. En una modalidad, las poblaciones de células que comprenden células T, que se han tratado con uno o más inhibidores de PI3K están enriquecidas para una población de células T CD8⁺ que coexpresan uno o más o, o todos, los siguientes biomarcadores: CD62L, CD127, CD197 y CD38.

En una modalidad, las poblaciones de células que comprenden células T, que se han tratado con uno o más inhibidores de PI3K están enriquecidas para una población de células T CD8⁺ que coexpresan uno o más o, o todos, los siguientes biomarcadores: CD62L, CD127, CD27 y CD8.

En una modalidad, se fabrican células T modificadas que comprenden niveles sostenidos de proliferación y disminución de la diferenciación. En una modalidad particular, las células T se fabrican al estimular a las células T para que se activen y proliferen en presencia de una o más señales estimuladoras y un agente que es un inhibidor de una vía de señalización celular PI3K.

Las células T pueden modificarse después para expresar un CAR anti-CD79A. En una modalidad, las células T se modifican al transducir las células T con un vector viral que comprende un CAR anti-CD79A contemplado en la presente descripción. En una cierta modalidad, las células T se modifican antes de la estimulación y activación en presencia de un inhibidor de una vía de señalización celular PI3K. En otra modalidad, las células T se modifican después de la estimulación y activación en presencia de un inhibidor de una vía de señalización celular PI3K. En una modalidad particular, las células T se modifican dentro de 12 horas, 24 horas, 36 horas o 48 horas después de la estimulación y activación en presencia de un inhibidor de una vía de señalización celular PI3K.

Después de activar las células T, las células se cultivan para proliferar. Las células T pueden cultivarse durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, al menos 2 semanas, al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses o más, con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más rondas de expansión.

En diversas modalidades, las composiciones de células T se fabrican en presencia de uno o más inhibidores de una vía de señalización celular PI3K/Akt/mTOR. Los inhibidores pueden dirigirse a una o más actividades en la vía o a una sola actividad. Sin desear unirse a ninguna teoría en particular, se contempla que el tratamiento o el contacto de las células T con uno o más inhibidores de la vía PI3K durante las fases de estimulación, activación y/o expansión del proceso de fabricación aumenta preferentemente las células T jóvenes, produciendo de esta manera composiciones de células T terapéuticas superiores.

En una modalidad particular, se proporciona un método para aumentar la proliferación de células T que expresan un receptor de células T manipulado. Dichos métodos pueden comprender, por ejemplo, cosechar una fuente de células T de un sujeto, estimular y activar las células T en presencia de uno o más inhibidores de la vía PI3K, modificar las células T para expresar un CAR anti-CD79A y expandir las células T en cultivo.

En una cierta modalidad, se contempla un método para producir poblaciones de células T enriquecidas para la expresión de uno o más de los siguientes biomarcadores: CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197, CD38 y CD8 se completa. En una modalidad, las células T jóvenes comprenden uno o más de, o todos, los siguientes marcadores biológicos: CD62L, CD127, CD197 y CD38.

En una modalidad, las células T jóvenes comprenden uno o más de, o todos, los siguientes marcadores biológicos: CD62L, CD127, CD27 y CD8.

En una modalidad, se proporcionan células T jóvenes que carecen de la expresión de CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 y LAG3. Como se analiza en otra parte en la presente descripción, los niveles de expresión de los biomarcadores en células T jóvenes son relativos a los niveles de expresión de dichos marcadores en células T o poblaciones de células efectoras inmunitarias más diferenciadas.

En una modalidad, se usan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como la fuente de células T en los métodos de fabricación de células T contemplados en la presente descripción. Las PBMC forman una población heterogénea de linfocitos T que pueden ser CD4⁺, CD8⁺ o CD4⁺ y CD8⁺, y pueden incluir otras células mononucleares tales como monocitos, células B, células NK y células NKT. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un TCR o CAR manipulado contemplado en modalidades particulares, se introduce en una población de células T, células NK o células NKT de un donante humano. En una modalidad particular, las células T transducidas exitosamente que portan el vector de expresión pueden clasificarse mediante el uso de citometría de flujo para aislar las células T positivas a CD3 y después propagarse adicionalmente para aumentar el número de células T modificadas, además de la activación celular mediante el uso de anticuerpos anti-CD3 y/o anticuerpos anti-CD28 e IL-2, IL-7 y/o IL-

15.

Los métodos de fabricación contemplados en la presente descripción pueden comprender además la criopreservación de las células T modificadas para el almacenamiento y/o preparación para su uso en un sujeto humano. En una modalidad, un método para almacenar células efectoras inmunitarias que expresan una proteína CAR murina, humana o humanizada modificada genéticamente que se dirigen a una célula que expresa CD79A, comprende criopreservar las células efectoras inmunitarias de manera que las células permanezcan viables al descongelarse. Una fracción de las células efectoras inmunitarias que expresan las proteínas CAR puede criopreservarse mediante métodos conocidos en la técnica, para proporcionar una fuente permanente de dichas células para el tratamiento futuro de pacientes afectados por una célula cancerosa que expresa CD79A. Las células T se criopreservan de manera que las células permanezcan viables tras la descongelación. Cuando sea necesario, las células efectoras inmunitarias transformadas criopreservadas pueden descongelarse, cultivarse y expandirse para obtener más células de este tipo. Como se usa en la presente, "criopreservación" se refiere a la conservación de células mediante enfriamiento a temperaturas por debajo de cero, tales como (típicamente) 77 K o -196 °C (el punto de ebullición del nitrógeno líquido). Los agentes crioprotectores se usan con frecuencia a temperaturas por debajo de cero para evitar que las células que se conservan se dañen debido a la congelación a bajas temperaturas o el calentamiento a temperatura ambiente. Los agentes criopreservantes y las velocidades de enfriamiento óptimas pueden proteger contra daños a las células. Los agentes crioprotectores que pueden usarse incluyen dimetilsulfóxido (DMSO) (Lovelock y Bishop, Nature, 1959; 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, Nature, 1961; 190: 1204-1205), glicerol, polivinilpirrolidina (Rinfret, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1960; 85: 576) y polietilenglicol (Sloviter y Ravdin, Nature, 1962; 196: 48). La velocidad de enfriamiento preferida es 1 °C a 3 °C/minuto. Después de al menos dos horas, las células T han alcanzado una temperatura de -80 °C y pueden colocarse directamente en nitrógeno líquido (-196 °C) para su almacenamiento permanente, tal como en un recipiente de almacenamiento criogénico a largo plazo.

1. Células T

En modalidades particulares, se proporciona la fabricación de composiciones de células T-CAR mejoradas. Las células T usadas para la producción de células T-CAR pueden ser autólogas/autogénicas ("propias") o no autólogas ("no propias", por ejemplo, alogénicas, singénicas o xenogénicas). En modalidades preferidas, las células T se obtienen de un sujeto mamífero. En una modalidad más preferida, las células T se obtienen de un sujeto primate. En la modalidad más preferida, las células T se obtienen de un sujeto humano.

Las células T pueden obtenerse de una serie de fuentes, lo que incluye células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre del cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo, y tumores. En ciertas modalidades, las células T pueden obtenerse a partir de una unidad de sangre recolectada de un sujeto mediante el uso de cualquier número de técnicas conocidas por el experto en la técnica, tales como sedimentación, por ejemplo, la separación por FICOLL™. En una modalidad, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen por aféresis. El producto de la aféresis contiene típicamente linfocitos, lo que incluye linfocitos T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En una modalidad, las células recolectadas mediante aféresis pueden lavarse para eliminar la fracción plasmática y colocar las células en un tampón o medio apropiado para el procesamiento posterior. Las células pueden lavarse con PBS o con otra solución adecuada que carezca de calcio, magnesio y de la mayoría, si no todos los demás, cationes divalentes. Como apreciarán los expertos en la técnica, una etapa de lavado puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, tal como mediante el uso de una centrifuga de flujo semiautomatizado. Por ejemplo, el procesador de células Cobe 2991, el Baxter CytoMate, o similares. Después de lavarse, las células pueden resuspenderse en una variedad de tampones biocompatibles u otra solución salina con o sin tampón. En ciertas modalidades, los componentes no convenientes de la muestra de aféresis pueden eliminarse en el medio de cultivo en el que están resuspendidas las células directamente.

En modalidades particulares, se usa una población de células que comprenden células T, por ejemplo, PBMC, en los métodos de fabricación contemplados en la presente descripción. En otras modalidades, se usa una población de células T aisladas o purificadas en los métodos de fabricación contemplados en la presente descripción. Las células pueden aislarse de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante el lisado de los glóbulos rojos y el agotamiento de los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™. En algunas modalidades, después del aislamiento de las PBMC, tanto los linfocitos T citotóxicos como los cooperadores pueden clasificarse en subpoblaciones de células T vírgenes, de memoria y efectores ya sea antes o después de la activación, expansión y/o modificación genética.

En modalidades particulares, se usa una población de células que comprenden células T, por ejemplo, PBMC, en los métodos de fabricación contemplados en la presente descripción. En otras modalidades, se usa una población de células T aisladas o purificadas en los métodos de fabricación contemplados en la presente descripción. Las células pueden aislarse de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante el lisado de los glóbulos rojos y el agotamiento de los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™. En algunas modalidades, después del aislamiento de las PBMC, tanto los linfocitos T citotóxicos como los cooperadores pueden clasificarse en subpoblaciones de células T vírgenes, de memoria y efectores ya sea antes o después de la activación, expansión y/o modificación genética.

En modalidades particulares, la población de células efectoras inmunitarias se fabrica a partir de PBMC que se modifican genéticamente para expresar los CAR mediante el uso de métodos contemplados en la presente descripción, pero que no se someten a selección positiva o negativa. En ciertas modalidades, después del aislamiento de las PBMC, los linfocitos T se aíslan adicionalmente y en ciertas modalidades, tanto los linfocitos T citotóxicos como los cooperadores pueden clasificarse en subpoblaciones de células T vírgenes, de memoria y efectores ya sea antes o después de la modificación genética y/o la expansión.

En ciertas modalidades, la subpoblación específica de células T, que expresan uno o más de los siguientes marcadores: CD3, CD4, CD8, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62, CD127 y HLA-DR, puede aislarse adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. En una modalidad, una subpoblación específica de células T, que expresan uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en i) CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197; ii) CD62L, CD127, CD197 y CD38 o iii) CD62L, CD127, CD27 y CD8, se aísla además mediante técnicas de selección positiva o negativa. En diversas modalidades, las composiciones de células T fabricadas no expresan o no expresan sustancialmente uno o más de los siguientes marcadores: CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 y LAG3.

En una modalidad, la expresión de uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en i) CD62L, CD127, CD197 y CD38 o ii) CD62L, CD127, CD27 y CD8, se aumenta al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces o más, en comparación con una población de células T activadas y expandidas sin un inhibidor de PI3K. En una modalidad, las células T comprenden células T CD8⁺.

En una modalidad, la expresión de uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 y LAG3 se disminuye al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces o más, en comparación con una población de células T activadas y expandidas con un inhibidor de PI3K. En una modalidad, las células T comprenden células T CD8⁺.

En una modalidad, los métodos de fabricación contemplados en la presente descripción aumentan el número de células T-CAR que comprenden uno o más marcadores de células T vírgenes o potentes para el desarrollo. Sin desear unirse a ninguna teoría en particular, los presentes inventores creen que el tratamiento de una población de células que comprenden células T con uno o más inhibidores de PI3K da como resultado un aumento en la expansión de células T potentes para el desarrollo y proporciona una inmunoterapia adoptiva con células T-CAR más robusta y eficaz en comparación con las terapias existentes con células T-CAR.

Ejemplos ilustrativos de marcadores de células T vírgenes o potentes para el desarrollo aumentados en células T fabricadas mediante el uso de los métodos contemplados en modalidades particulares incluyen i) CD62L, CD127, CD197 y CD38 o ii) CD62L, CD127, CD27 y CD8. En modalidades particulares, las células T vírgenes no expresan o no expresan sustancialmente uno o más de los siguientes marcadores: CD57, CD244, CD160, PD-1, BTLA, CD45RA, CTLA4, TIM3 y LAG3.

Con respecto a las células T, las poblaciones de células T resultantes de las diversas metodologías de expansión contempladas en la presente descripción pueden tener una variedad de propiedades fenotípicas específicas, en dependencia de las condiciones empleadas. En diversas modalidades, las poblaciones de células T expandidas comprenden uno o más de los siguientes marcadores fenotípicos: CD62L, CD27, CD127, CD197, CD38, CD8 y HLA-DR.

En una modalidad, dichos marcadores fenotípicos incluyen una expresión potenciada de uno o más de, o todos, CD62L, CD127, CD197 y CD38. En modalidades particulares, se expanden linfocitos T CD8⁺ caracterizados por la expresión de marcadores fenotípicos de células T vírgenes, lo que incluye CD62L, CD127, CD197 y CD38.

En una modalidad, dichos marcadores fenotípicos incluyen una expresión potenciada de uno o más de, o todos, CD62L, CD127, CD27 y CD8. En modalidades particulares, se expanden linfocitos T CD8⁺ caracterizados por la expresión de marcadores fenotípicos de células T vírgenes, lo que incluye CD62L, CD127, CD27 y CD8.

En modalidades particulares, se expanden células T caracterizadas por la expresión de marcadores fenotípicos de células T de memoria central, lo que incluye CD45RO, CD62L, CD127, CD 197 y CD38 y negativas para granzima B. En algunas modalidades, las células T de memoria central son células T CD45RO⁺, CD62L⁺, CD8⁺.

En ciertas modalidades, se expanden linfocitos T CD4⁺ caracterizados por la expresión de marcadores fenotípicos de células CD4⁺ vírgenes, lo que incluye CD62L y negativas para la expresión de CD45RA y/o CD45RO. En algunas modalidades, células CD4⁺ caracterizadas por la expresión de marcadores fenotípicos de células CD4⁺ de memoria central, lo que incluye positivas para CD62L y CD45RO. En algunas modalidades, las células efectoras CD4⁺ son positivas para CD62L y negativas para CD45RO.

En ciertas modalidades, las células T se aíslan de un individuo y se activan y estimulan a proliferar in vitro antes de

modificarse genéticamente para expresar un CAR anti-CD79A. Con respecto a esto, las células T pueden cultivarse antes y/o después de modificarse genéticamente (es decir, transducirse o transfectarse para expresar un CAR anti-CD79A contemplado en la presente descripción).

5 2. Activación y expansión

Para lograr suficientes dosis terapéuticas de composiciones de células T, las células T con frecuencia se someten a una o más rondas de estimulación, activación y/o expansión. Las células T pueden activarse y expandirse generalmente mediante el uso de métodos como se describió, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; y 6,867,041. Las células T modificadas para expresar un CAR anti-CD79A pueden activarse y expandirse antes y/o después de que se modifiquen las células T. Además, las células T pueden ponerse en contacto con uno o más agentes que modulan una vía de señalización celular PI3K/Akt/mTOR antes, durante y/o después de la activación y/o expansión. En una modalidad, las células T fabricadas mediante los métodos contemplados en la presente descripción se someten a una, dos, tres, cuatro o cinco o más rondas de activación y expansión, cada una de las cuales puede incluir uno o más agentes que modulan una vía de señalización celular PI3K/Akt/mTOR.

Las células presentadoras de antígeno artificiales (APCa) soportan el crecimiento *ex vivo* y la expansión a largo plazo de células T CD8⁺ humanas funcionales sin requerir la adición de citocinas exógenas, por el contrario al uso de APC naturales. En modalidades particulares, las PBMC o células T aisladas se ponen en contacto con un agente estimulador y un agente coestimulador, tales como anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, unidos generalmente a una perla u otra superficie, en un medio de cultivo con citocinas apropiadas, tales como IL-2, IL-7 y/o IL-15.

En otras modalidades, se producen APC artificiales (APCa) mediante la manipulación genética de células K562, U937, 721.221, T2 y C1R para dirigir la expresión y secreción estables de una variedad de moléculas y citocinas coestimuladoras. En una modalidad particular, las APCa de K32 o U32 se usan para dirigir la visualización de una o más moléculas estimuladoras basadas en anticuerpos en la superficie celular de la AAPC. Las poblaciones de células T pueden expandirse mediante APCa que expresan una variedad de moléculas coestimuladoras, lo que incluye CD137L (4-1BBL), CD134L (OX40L) y/o CD80 o CD86. Las APCa proporcionan una plataforma eficiente para expandir células T modificadas genéticamente y para mantener la expresión de CD28 en células T CD8⁺. Las APCa se proporcionan en los documentos WO 03/057171 y US2003/0147869.

En una modalidad, se presenta un ligando coestimulador en una célula que presenta un antígeno (por ejemplo, una APCa, una célula dendrítica, una célula B, y similares) que se une específicamente a una molécula coestimuladora cognada en una célula T, proporcionando de esta manera una señal que, además de la señal primaria proporcionada por, por ejemplo, la unión de un complejo TCR/CD3, media una respuesta deseada de células T. Los ligandos coestimuladores adecuados incluyen CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulador inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor de linfotoxina beta, ILT3, ILT4, un agonista o anticuerpo que se une al receptor del ligando Toll, y un ligando que se une específicamente a B7-H3.

En una modalidad particular, un ligando coestimulador comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este que se une específicamente a una molécula coestimuladora presente en una célula T, lo que incluye CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, ICOS, antígeno asociado a la función linfocitaria-1 (LFA-1), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente a CD83.

Los ligandos coestimuladores adecuados incluyen además antígenos objetivo, que pueden proporcionarse en forma soluble o expresados en APC o APCa que se unen a TCR o CAR manipulados expresados en células T modificadas.

En diversas modalidades, un método para fabricar células T contempladas en la presente descripción comprende activar una población de células que comprenden células T y expandir la población de células T. La activación de las células T puede llevarse a cabo al proporcionar una señal de estimulación primaria a través del complejo TCR/CD3 de las células T o mediante la estimulación de la proteína de superficie CD2, y al proporcionar una señal de coestimulación secundaria a través de una molécula accesoria, por ejemplo, CD28.

El complejo TCR/CD3 puede estimularse al ponerse en contacto la célula T con un agente de unión a CD3 adecuado, por ejemplo, un ligando de CD3 o un anticuerpo monoclonal anti-CD3. Ejemplos ilustrativos de anticuerpos anti-CD3 incluyen OKT3, G19-4, BC3 y 64.1.

En otra modalidad, puede usarse un agente de unión a CD2 para proporcionar una señal de estimulación primaria a las células T. Ejemplos ilustrativos de agentes de unión a CD2 incluyen ligandos de CD2 y anticuerpos anti-CD2, por ejemplo, el anticuerpo T11.3 en combinación con el anticuerpo T11.1 o T11.2 (Meuer, S. C. y otros (1984) Cell 36:897-906) y el anticuerpo 9.6 (que reconoce el mismo epítipo que TI 1.1) en combinación con el anticuerpo 9-1 (Yang, S. Y. y otros (1986) J. Immunol. 137:1097-1100). Pueden usarse además otros anticuerpos que se unen a los mismos epítopos que cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente. Pueden prepararse e identificarse anticuerpos

adicionales, o combinaciones de anticuerpos, mediante técnicas estándar como se describe en otra parte en la presente descripción.

Además de la señal de estimulación primaria proporcionada a través del complejo TCR/CD3, o mediante CD2, la inducción de respuestas de las células T requiere una segunda señal coestimuladora. En modalidades particulares, puede usarse un agente de unión a CD28 para proporcionar una señal coestimuladora. Ejemplos ilustrativos de agentes de unión a CD28 incluyen: ligandos de CD28 naturales, por ejemplo, un ligando natural para CD28 (por ejemplo, un miembro de la familia de proteínas B7, tal como B7-1(CD80) y B7-2 (CD86); y un anticuerpo monoclonal anti-CD28 o un fragmento de este capaz de reticular la molécula CD28, por ejemplo, anticuerpos monoclonales 9,3, B-T3, XR-CD28, KOLT-2, 15E8, 248.23.2 y EX5.3D10.

En una modalidad, la molécula que proporciona la señal de estimulación primaria, por ejemplo, una molécula que proporciona estimulación a través del complejo TCR/CD3 o CD2, y la molécula coestimuladora, se acoplan a la misma superficie.

En ciertas modalidades, los agentes de unión que proporcionan señales estimuladoras y coestimuladoras se localizan en la superficie de una célula. Esto puede llevarse a cabo al transfectar o transducir una célula con un ácido nucleico que codifica el agente de unión en una forma adecuada para su expresión en la superficie celular, o alternativamente al acoplar un agente de unión a la superficie celular.

En otra modalidad, la molécula que proporciona la señal de estimulación primaria, por ejemplo, una molécula que proporciona estimulación a través del complejo TCR/CD3 o CD2, y la molécula coestimuladora, se muestran en las células presentadoras de antígenos.

En una modalidad, la molécula que proporciona la señal de estimulación primaria, por ejemplo, una molécula que proporciona estimulación a través del complejo TCR/CD3 o CD2, y la molécula coestimuladora, se proporcionan en superficies separadas.

En una cierta modalidad, uno de los agentes de unión que proporcionan señales estimuladoras y coestimuladoras es soluble (proporcionado en solución) y el(los) otro(s) agente(s) se proporciona(n) en una o más superficies.

En una modalidad particular, los agentes de unión que proporcionan señales estimuladoras y coestimuladoras se proporcionan ambos en una forma soluble (proporcionados en solución).

En diversas modalidades, los métodos para fabricar células T contempladas en la presente descripción comprenden activar las células T con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28.

Las composiciones de células T fabricadas mediante los métodos contemplados en modalidades particulares comprenden células T activadas y/o expandidas en presencia de uno o más agentes que inhiben una vía de señalización celular PI3K. Las células T modificadas para expresar un CAR anti-CD79A pueden activarse y expandirse antes y/o después de que se modifiquen las células T. En modalidades particulares, una población de células T se activa, se modifica para expresar un CAR anti-CD79A, y después se cultiva para su expansión.

En una modalidad, las células T fabricadas mediante los métodos contemplados en la presente descripción comprenden un aumento del número de células T que expresan marcadores indicativos de un alto potencial proliferativo y de la capacidad de autorrenovarse, pero que no expresan o expresan marcadores sustancialmente indetectables de diferenciación de células T. Estas células T pueden activarse y expandirse repetidamente de manera robusta y proporcionar de esta manera una composición de células T terapéuticas mejorada.

En una modalidad, una población de células T activadas y expandidas en presencia de uno o más agentes que inhiben una vía de señalización celular PI3K se expande al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 250 veces, al menos 500 veces, al menos 1000 veces o más, en comparación con una población de células T activadas y expandidas sin un inhibidor de PI3K.

En una modalidad, una población de células T caracterizada por la expresión de marcadores de células T jóvenes activadas y expandidas en presencia de uno o más agentes que inhiben una vía de señalización celular PI3K se expande al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 250 veces, al menos 500 veces, al menos 1000 veces, o más, en comparación con la población de células T activadas y expandidas sin un inhibidor de PI3K.

En una modalidad, la expansión de las células T activadas mediante los métodos contemplados en la presente descripción comprende además cultivar una población de células que comprenden células T durante varias horas (aproximadamente 3 horas) a aproximadamente 7 días a aproximadamente 28 días o cualquier valor entero por hora

entre ellos. En otra modalidad, la composición de células T puede cultivarse durante 14 días. En una modalidad particular, las células T se cultivan durante aproximadamente 21 días. En otra modalidad, las composiciones de células T se cultivan durante aproximadamente 2-3 días. También pueden desearse varios ciclos de estimulación/activación/expansión, de manera que el tiempo de cultivo de las células T puede ser de 60 días o más.

En modalidades particulares, las condiciones apropiadas para el cultivo de células T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, medio esencial mínimo o medio RPMI 1640 o, X-vivo 15, (Lonza)) y uno o más factores necesarios para la proliferación y viabilidad, lo que incluye suero (por ejemplo, suero humano o bovino fetal), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, IL-7, IL-21, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β y TNF- α o cualquier otro aditivo adecuado para el crecimiento de células conocido por el experto en la técnica.

Otros ejemplos ilustrativos de medios de cultivo celular incluyen RPMI 1640, Clicks, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, ya sea sin suero o complementado con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina(s) suficiente para el crecimiento y expansión de las células T.

Ejemplos ilustrativos de otros aditivos para la expansión de las células T incluyen surfactantes, piasmanato, tampones del pH tales como HEPEs, y agentes reductores tales como N-acetilcisteína y 2-mercaptoetanol

Se incluyen antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomina, solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se van a infundir en un sujeto. Las células objetivo se mantienen en las condiciones necesarias para soportar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura (por ejemplo, 37 °C) y atmósfera apropiadas (por ejemplo, aire más 5 % de CO₂).

3. Agentes

En diversas modalidades, se proporciona un método para fabricar células T que expande células T indiferenciadas o potentes para el desarrollo, que comprende poner en contacto las células T con un agente que modula una vía PI3K en las células. En diversas modalidades, se proporciona un método para fabricar células T que expande células T indiferenciadas o potentes para el desarrollo, que comprende poner en contacto las células T con un agente que modula una vía PI3K/AKT/mTOR en las células. Las células pueden ponerse en contacto antes, durante y/o después de la activación y expansión. Las composiciones de células T conservan una suficiente potencia de las células T de manera que pueden someterse a múltiples rondas de expansión sin un aumento sustancial en la diferenciación.

Como se usa en la presente, los términos "modular", "modulador" o "agente modificador" o términos comparables se refieren a la capacidad de un agente para inducir un cambio en una vía de señalización celular. Un modulador puede aumentar o disminuir una cantidad, actividad de un componente de la vía, o aumentar o disminuir un efecto o resultado deseados de una vía de señalización celular. En una modalidad, el modulador es un inhibidor. En otra modalidad, el modulador es un activador.

Un "agente" se refiere a un compuesto, molécula pequeña, por ejemplo, molécula orgánica pequeña, ácido nucleico, polipéptido, o un fragmento, isoforma, variante, análogo o derivado de este usado en la modulación de una vía PI3K/AKT/mTOR.

Una "molécula pequeña" se refiere a una composición que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 5 kD, menos de aproximadamente 4 kD, menos de aproximadamente 3 kD, menos de aproximadamente 2 kD, menos de aproximadamente 1 kD o menos de aproximadamente 0,5 kD. Las moléculas pequeñas pueden comprender ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, peptoides, carbohidratos, lípidos, componentes de estos, u otras moléculas orgánicas o inorgánicas. Las bibliotecas de mezclas químicas y/o biológicas, tales como extractos fúngicos, bacterianos o de algas, se conocen en la técnica y pueden tamizarse con cualquiera de los ensayos. Ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares pueden encontrarse en: (Carell y otros, 1994a; Carell y otros, 1994b; Cho y otros, 1993; DeWitt y otros, 1993; Gallop y otros, 1994; Zuckermann y otros, 1994).

Un "análogo" se refiere a un compuesto orgánico pequeño, un nucleótido, una proteína, o un polipéptido que posee una actividad o función(es) similar(es) o idéntica(s) al compuesto, nucleótido, proteína o polipéptido o compuesto que tiene la actividad deseada, pero no necesita comprender necesariamente una secuencia o estructura que es similar o idéntica a la secuencia o estructura de la modalidad preferida.

Un "derivado" se refiere a un compuesto, una proteína o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína o polipéptido original que se ha alterado mediante la introducción de sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácidos, o un ácido nucleico o nucleótido que se ha modificado mediante la introducción de sustituciones o deleciones, adiciones o mutaciones de nucleótidos. El derivado de ácido nucleico, nucleótido, proteína o polipéptido posee una función similar o idéntica a la del polipéptido original.

En diversas modalidades, el agente que modula una vía PI3K activa un componente de la vía. Un "activador" o "agonista" se refiere a un agente que promueve, aumenta o induce una o más actividades de una molécula en una vía

PI3K/AKT/mTOR, lo que incluye, sin limitación, una molécula que activa una o más actividades de una PI3K.

En diversas modalidades, el agente que modula una vía PI3K inhibe un componente de la vía. Un "inhibidor" o "antagonista" se refiere a un agente que inhibe, disminuye o reduce una o más actividades de una molécula en una vía PI3K/AKT/mTOR, lo que incluye, sin limitación, una molécula que inhibe una o más actividades de una PI3K. En una modalidad, el inhibidor es un inhibidor de molécula dual. En una modalidad particular, el inhibidor puede inhibir una clase de moléculas que tienen las mismas actividades o actividades sustancialmente similares (un paninhibidor) o puede inhibir específicamente una actividad de la molécula (un inhibidor selectivo o específico). La inhibición puede ser además irreversible o reversible.

En una modalidad, el inhibidor tiene una IC₅₀ de al menos 1 nM, al menos 2 nM, al menos 5 nM, al menos 10 nM, al menos 50 nM, al menos 100 nM, al menos 200 nM, al menos 500 nM, al menos 1 μM, al menos 10 μM, al menos 50 μM o al menos 100 μM. Las determinaciones de la IC₅₀ pueden llevarse a cabo mediante el uso de cualquier técnica convencional conocida en la técnica. Por ejemplo, una IC₅₀ puede determinarse al medir la actividad de una enzima dada en presencia de un intervalo de concentraciones del inhibidor en estudio. Los valores de actividad enzimática obtenidos experimentalmente se representan gráficamente entonces contra las concentraciones de inhibidor usadas. La concentración del inhibidor que muestra el 50 % de actividad enzimática (en comparación con la actividad en ausencia de cualquier inhibidor) se toma como el valor de "IC₅₀". De manera análoga, pueden definirse otras concentraciones inhibitoras a través de determinaciones apropiadas de la actividad.

En diversas modalidades, las células T se ponen en contacto o se tratan o cultivan con uno o más moduladores de una vía PI3K/AKT/mTOR a una concentración de al menos 1 nM, al menos 2 nM, al menos 5 nM, al menos 10 nM, al menos 50 nM, al menos 100 nM, al menos 200 nM, al menos 500 nM, al menos 1 μM, al menos 10 μM, al menos 50 μM, al menos 100 μM o al menos 1 M.

En modalidades particulares, las células T pueden ponerse en contacto o tratarse o cultivarse con uno o más moduladores de una vía PI3K/AKT/mTOR durante al menos 12 horas, 18 horas, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, al menos 2 semanas, al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses o más, con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más rondas de expansión.

La vía fosfatidil-inositol-3 quinasa/Akt/objetivo de la rapamicina de mamíferos sirve como conducto para integrar la señalización del factor de crecimiento con la proliferación, la diferenciación, el metabolismo y la supervivencia celular. Las PI3K son una familia de lípido-quinasas intracelulares altamente conservadas. Las PI3K de clase IA se activan mediante tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento (RTK), ya sea directamente o a través de la interacción con la familia de moléculas adaptadoras del sustrato receptor de insulina. Esta actividad da como resultado la producción de fosfatidil-inositol-3,4,5-trisfosfato (PIP₃) un regulador de la serina/treonina quinasa Akt. mTOR actúa a través de la vía canónica PI3K mediante 2 complejos distintos, cada uno caracterizado por diferentes ligandos que confieren actividades distintas. mTORC1 (mTOR en complejo con PRAS40, raptor, y mLST8/GbL) actúa como un efector aguas abajo de la señalización de PI3K/Akt, enlazando las señales del factor de crecimiento con la traducción de proteínas, el crecimiento celular, la proliferación, y la supervivencia. mTORC2 (mTOR en complejo con rictor, mSIN1, protor, y mLST8) actúa como un activador aguas arriba de Akt.

Después de la activación mediada por el receptor del factor de crecimiento de PI3K, Akt se recluta a la membrana a través de la interacción de su dominio de homología a pleckstrina con PIP₃, exponiendo por tanto su bucle de activación y permitiendo la fosforilación en la treonina 308 (Thr308) por la proteína quinasa dependiente de fosfoinositida 1 (PDK1) constitutivamente activa. Para una activación máxima, Akt también se fosforila por mTORC2, en la serina 473 (Ser473) de su motivo hidrófobo C-terminal. También se ha demostrado que ADN-PK y HSP son importantes en la regulación de la actividad de Akt. Akt activa mTORC1 a través de la fosforilación inhibitoria de TSC2, que junto con TSC1, regula negativamente mTORC1 al inhibir la Rheb GTPasa, un regulador positivo de mTORC1. mTORC1 tiene 2 sustratos bien definidos, p70S6K (denominado en lo sucesivo S6K1) y 4E-BP1, los cuales regulan críticamente la síntesis de proteínas. Por tanto, mTORC1 es un importante efector aguas abajo de PI3K, que enlaza la señalización del factor de crecimiento con la traducción de proteínas y la proliferación celular.

a. Inhibidores de PI3K

Como se usa en la presente, el término "inhibidor de PI3K" se refiere a un ácido nucleico, péptido, compuesto o molécula orgánica pequeña que se une e inhibe al menos una actividad de PI3K. Las proteínas PI3K pueden dividirse en tres clases, PI3K de clase 1, PI3K de clase 2 y PI3K de clase 3. Las PI3K de clase 1 existen como heterodímeros que consisten de una de cuatro subunidades catalíticas p110 (p110α, p110β, p110δ y p110γ) y una de dos familias de subunidades reguladoras. Un inhibidor de PI3K se dirige, preferentemente, a inhibidores de PI3K de clase 1. En una modalidad, un inhibidor de PI3K mostrará selectividad para una o más isoformas de los inhibidores de PI3K de clase 1 (es decir, selectividad para p110α, p110β, p110δ y p110γ o una o más de p110α, p110β, p110δ y p110γ). En otro aspecto, un inhibidor de PI3K no mostrará selectividad de isoforma y se considerará un "paninhibidor de PI3K". En una modalidad, un inhibidor de PI3K competirá por la unión con ATP al dominio catalítico de PI3K.

En ciertas modalidades, un inhibidor de PI3K puede, por ejemplo, dirigirse a PI3K así como también a proteínas adicionales en la vía PI3K-AKT-mTOR. En modalidades particulares, un inhibidor de PI3K que se dirige tanto a mTOR

como a PI3K puede denominarse un inhibidor de mTOR o un inhibidor de PI3K. Un inhibidor de PI3K que solo se dirige a PI3K puede denominarse un inhibidor selectivo de PI3K. En una modalidad, puede entenderse que un inhibidor selectivo de PI3K se refiere a un agente que exhibe una concentración inhibitoria del 50 % con respecto a PI3K que es al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces o más, menor que la IC50 del inhibidor con respecto a mTOR y/u otras proteínas en la vía.

En una modalidad particular, los inhibidores de PI3K ilustrativos inhiben a PI3K con una IC50 (concentración que inhibe el 50 % de la actividad) de aproximadamente 200 nM o menos, preferentemente, aproximadamente 100 nm o menos, aún con mayor preferencia, aproximadamente 60 nM o menos, aproximadamente 25 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 1 nM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 1 µM o menos. En una modalidad, un inhibidor de PI3K inhibe a PI3K con una IC50 de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 100 nm, con mayor preferencia, de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 50 nM, aún con mayor preferencia, de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 15 nM.

Ejemplos ilustrativos de inhibidores de PI3K adecuados para su uso en los métodos de fabricación de células T contemplados en modalidades particulares incluyen BKM120 (inhibidor de PI3K de clase 1, Novartis), XI,147 (inhibidor de PI3K de clase 1, Exelixis), (paninhibidor de PI3K, GlaxoSmithKline) y PX-866 (inhibidor de PI3K de clase 1; isoformas p110α, p110β y p110γ, Oncothyreon).

Otros ejemplos ilustrativos de inhibidores selectivos de PI3K incluyen BYL719, GSK2636771, TGX-221, AS25242, CAL-101, ZSTK474 e IPI-145.

Ejemplos ilustrativos adicionales de paninhibidores de PI3K incluyen BEZ235, LY294002, GSK1059615, TG100713 y GDC-0941.

En una modalidad preferida, el inhibidor de PI3K es ZSTK474.

b. Inhibidores de AKT

Como se usa en la presente, el término "inhibidor de AKT" se refiere a un ácido nucleico, péptido, compuesto o molécula orgánica pequeña que inhibe al menos una actividad de AKT. Los inhibidores de AKT pueden agruparse en varias clases, lo que incluye inhibidores basados en lípidos (por ejemplo, inhibidores dirigidos al dominio de homología de la pleckstrina de AKT que impide que AKT se localice a las membranas plasmáticas), inhibidores competitivos de ATP e inhibidores alostéricos. En una modalidad, los inhibidores de AKT actúan al unirse al sitio catalítico de AKT. En una modalidad particular, los inhibidores de Akt actúan al inhibir la fosforilación de objetivos de AKT aguas abajo tales como mTOR. En otra modalidad, la actividad de AKT se inhibe al inhibir las señales de entrada para activar Akt al inhibir, por ejemplo, la activación por ADN-PK de AKT, la activación por PDK-1 de AKT y/o la activación por mTORC2 de Akt.

Los inhibidores de AKT pueden dirigirse a las tres isoformas de AKT, AKT1, AKT2, AKT3, o pueden ser selectivos de isoforma y dirigirse solo a una o dos de las isoformas de AKT. En una modalidad, un inhibidor de AKT puede dirigirse a AKT, así como también a proteínas adicionales en la vía PI3K-AKT-mTOR. Un inhibidor de AKT que solo se dirige a AKT puede denominarse un inhibidor selectivo de AKT. En una modalidad, puede entenderse que un inhibidor selectivo de AKT se refiere a un agente que exhibe una concentración inhibitoria del 50 % con respecto a AKT que es al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces o más baja, que la IC50 del inhibidor con respecto a otras proteínas en la vía.

En una modalidad particular, los inhibidores de AKT ilustrativos inhiben a AKT con una IC50 (concentración que inhibe el 50 % de la actividad) de aproximadamente 200 nM o menos, preferentemente, aproximadamente 100 nm o menos, aún con mayor preferencia, aproximadamente 60 nM o menos, aproximadamente 25 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 1 nM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 1 µM o menos. En una modalidad, un inhibidor de AKT inhibe a AKT con una IC50 de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 100 nm, con mayor preferencia, de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 50 nM, aún con mayor preferencia, de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 15 nM.

Ejemplos ilustrativos de inhibidores de AKT para su uso en combinación con conjugados anticuerpo-fármaco basados en auristatina incluyen, por ejemplo, perifosina (Keryx), MK2206 (Merck), VQD-002 (VioQuest), XI,418 (Exelixis), GSK690693, GDC- 0068 y PX316 (PROLX Pharmaceuticals).

Un ejemplo ilustrativo no limitante de un inhibidor selectivo de Akt1 es A-674563.

Un ejemplo ilustrativo no limitante de un inhibidor selectivo de Akt2 es CCT128930.

En modalidades particulares, el inhibidor de Akt inhibe la activación por ADN-PK de Akt, la activación por PDK-1 de Akt, la activación por mTORC2 de Akt o la activación por HSP de Akt.

Ejemplos ilustrativos de inhibidores de ADN-PK incluyen NU7441, PI-103, NU7026, PIK-75 y PP-121.

c. Inhibidores de mTOR

5 Los términos "inhibidor de mTOR" o "agente que inhibe mTOR" se refieren a un ácido nucleico, péptido, compuesto o molécula orgánica pequeña que inhibe al menos una actividad de una proteína mTOR, tal como, por ejemplo, la actividad serina/treonina proteína quinasa en al menos uno de sus sustratos (por ejemplo, p70S6 quinasa 1, 4E-BP1, AKT/PKB y eEF2). Los inhibidores de mTOR son capaces de unirse directamente e inhibir mTORC1, mTORC2 o tanto mTORC1 como mTORC2.

10 La inhibición de la actividad de mTORC1 y/o mTORC2 puede determinarse por una reducción en la transducción de señales de la vía PI3K/Akt/mTOR. Puede utilizarse una amplia variedad de lecturas para establecer una reducción de la salida de dicha vía de señalización. Algunas lecturas ilustrativas no limitantes incluyen (1) una disminución en la fosforilación de Akt en los residuos, lo que incluye 5473 y T308; (2) una disminución en la activación de Akt como se evidencia, por ejemplo, mediante una reducción de la fosforilación de sustratos de Akt, lo que incluye FoxO1/O3a T24/32, GSK3α/β; S21/9 y TSC2 T1462; (3) una disminución en la fosforilación de moléculas de señalización aguas abajo de mTOR, lo que incluye S6 S240/244 ribosomal, 70S6K T389 y 4EBP1 T37/46; y (4) la inhibición de la proliferación de células cancerosas.

20 En una modalidad, los inhibidores de mTOR son inhibidores del sitio activo. Estos son inhibidores de mTOR que se unen al sitio de unión al ATP (también denominado bolsillo de unión al ATP) de mTOR e inhiben la actividad catalítica tanto de mTORC1 como de mTORC2. Una clase de inhibidores del sitio activo adecuados para su uso en los métodos de fabricación de células T contemplados en modalidades particulares, son inhibidores de doble especificidad que se dirigen e inhiben directamente tanto a PI3K como a mTOR. Los inhibidores de doble especificidad se unen tanto al sitio de unión al ATP de mTOR como de PI3K. Ejemplos ilustrativos de dichos inhibidores incluyen: imidazoquinazolinas, wortmanina, LY294002, PI-103 (Cayman Chemical), SF1126 (Semafore), BGT226 (Novartis), XI,765 (Exelixis) y NVP-BEZ235 (Novartis).

30 Otra clase de inhibidores del sitio activo de mTOR adecuados para su uso en los métodos contemplados en modalidades particulares inhiben selectivamente la actividad de mTORC1 y mTORC2 con relación a una o más fosfatidilinositol 3-quinazas de tipo I, por ejemplo, PI3 quinasa α, β, γ o δ. Estos inhibidores del sitio activo se unen al sitio activo de mTOR, pero no al de PI3K. Ejemplos ilustrativos de dichos inhibidores incluyen: pirazolopirimidinas, Torin1 (Guertin y Sabatini), PP242 (2-(4-amino-1-isopropil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-1H-indol-5-ol), PP30, KU-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth) AZD8055 (Liu y otros, Nature Review, 8, 627-644, 2009).

40 En una modalidad, un inhibidor selectivo de mTOR se refiere a un agente que exhibe una concentración inhibitoria del 50 % (IC₅₀) con respecto a mTORC1 y/o mTORC2, es decir, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces o más, menor que la IC₅₀ del inhibidor con respecto a una, dos, tres o más PI3-quinazas tipo I o a todas las PI3-quinazas tipo I.

45 Otra clase de inhibidores de mTOR se denomina en la presente descripción como "rapálogos". Como se usa en la presente, el término "rapálogos" se refiere a compuestos que se unen específicamente al dominio FRB (dominio de unión a la rapamicina-FKBP) de mTOR, están estructuralmente relacionados con la rapamicina, y conservan las propiedades inhibitorias de mTOR. El término rapálogos excluye la rapamicina. Los rapálogos incluyen ésteres, éteres, oximas, hidrazonas e hidroxilaminas de la rapamicina, así como también compuestos en los que los grupos funcionales en la estructura del núcleo de rapamicina se han modificado, por ejemplo, mediante reducción u oxidación. Las sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos también se consideran derivados de la rapamicina. Ejemplos ilustrativos de rapálogos adecuados para su uso en los métodos contemplados en modalidades particulares incluyen, sin limitación, temsirolimus (CC1779), everolimus (RAD001), deforolimus (AP23573), AZD8055 (AstraZeneca) y OSI-027 (OSI).

En una modalidad, el agente es el inhibidor de mTOR rapamicina (sirolimus).

55 En una modalidad particular, los inhibidores de mTOR ilustrativos inhiben ya sea a mTORC1 o mTORC2 o tanto a mTORC1 como a mTORC2 con una IC₅₀ (concentración que inhibe el 50 % de la actividad) de aproximadamente 200 nM o menos, preferentemente, aproximadamente 100 nm o menos, aún con mayor preferencia, aproximadamente 60 nM o menos, aproximadamente 25 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 1 nM, 100 μM, 50 μM, 25 μM, 10 μM, 1 μM o menos. En un aspecto, un inhibidor de mTOR ya sea mTORC1 o mTORC2 o tanto mTORC1 como mTORC2 con una IC₅₀ de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 100 nm, con mayor preferencia, de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 50 nM, aún con mayor preferencia, de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 15 nM.

65 En una modalidad, los inhibidores de mTOR ilustrativos inhiben ya sea PI3K como mTORC1 o mTORC2 o tanto mTORC1 y mTORC2 como PI3K con una IC₅₀ (concentración que inhibe el 50 % de la actividad) de aproximadamente 200 nM o menos, preferentemente, aproximadamente 100 nm o menos, aún con mayor preferencia, aproximadamente

60 nM o menos, aproximadamente 25 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 1 nM, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 1 μ M o menos. En un aspecto, un inhibidor de mTOR inhibe PI3K y mTORC1 o mTORC2 o tanto mTORC1 y mTORC2 y PI3K con una IC₅₀ de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 100 nm, con mayor preferencia, de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 50 nM, aún con mayor preferencia, de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 15 nM.

Ejemplos ilustrativos adicionales de inhibidores de mTOR adecuados para su uso en modalidades particulares AZD8055, INK128, rapamicina, PF-04691502 y everolimus.

Se ha demostrado que mTOR demuestra una actividad catalítica robusta y específica hacia las proteínas del sustrato fisiológico, la proteína quinasa ribosomal I p70 S6 (p70S6K1) y la proteína de unión a eIF4E 1 (4EBP1), medida mediante anticuerpos específicos de fósforo en transferencia de Western.

En una modalidad, el inhibidor de la vía PI3K/AKT/mTOR es un inhibidor de la quinasa s6 seleccionado del grupo que consiste en BI-D1870, H89, PF-4708671, FMK y AT7867.

H. Composiciones y formulaciones

Las composiciones contempladas en la presente descripción pueden comprender uno o más polipéptidos CAR, polinucleótidos, vectores que comprenden los mismos, células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente, etc., como se contempla en la presente descripción. Composiciones incluye composiciones farmacéuticas. Una "composición farmacéutica" se refiere a una composición formulada en soluciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables para su administración a una célula o un animal, ya sea sola, o en combinación con una o más modalidades de terapia. También se entenderá que, si se desea, las composiciones pueden administrarse en combinación con otros agentes, tales como, por ejemplo, citocinas, factores de crecimiento, hormonas, moléculas pequeñas, quimioterapéuticos, profármacos, fármacos, anticuerpos u otros diversos agentes farmacéuticamente activos. Prácticamente no existe límite a otros componentes que también pueden incluirse en las composiciones, siempre y cuando los agentes adicionales no afecten negativamente la capacidad de la composición para suministrar la terapia prevista.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente descripción para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, concorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

Como se usa en la presente, "portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye, sin limitación, cualquier adyuvante, portador, excipiente, deslizante, agente edulcorante, diluyente, conservante, tinte/colorante, potenciador del sabor, surfactante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, estabilizador, agente isotónico, solvente, surfactante o emulsionante que se ha aprobado por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos como aceptable para su uso en humanos o animales domésticos. Los portadores farmacéuticamente aceptables ilustrativos incluyen azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de papa; celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto; malta; gelatina; talco; manteca de cacao, ceras, grasas animales y vegetales, parafinas, siliconas, bentonitas, ácido silícico, óxido de zinc; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tampones, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones tampones de fosfato; y cualquier otra sustancia compatible empleada en formulaciones farmacéuticas.

En modalidades particulares, las composiciones comprenden una cantidad de células efectoras inmunitarias que expresan CAR contempladas en la presente descripción. Como se usa en la presente, el término "cantidad" se refiere a "una cantidad efectiva" o "una efectiva cantidad" de una célula terapéutica modificada genéticamente, por ejemplo, células T, para lograr un resultado profiláctico o terapéutico beneficioso o deseado, lo que incluye resultados clínicos.

Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad de una célula terapéutica modificada genéticamente efectiva para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, pero no necesariamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva es menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de una célula terapéutica modificada genéticamente puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de las células madre y progenitoras para inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del virus o células terapéuticas transducidas se ve superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" incluye una cantidad que es efectiva para "tratar" un sujeto (por ejemplo, un paciente). Cuando se indica una

cantidad terapéutica, la cantidad precisa de las composiciones a administrar puede determinarse por un médico considerando las diferencias individuales en edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis, y el estado del paciente (sujeto). Generalmente, puede indicarse que una composición farmacéutica que comprende las células T descritas en la presente descripción puede administrarse a una dosificación de 10^2 a 10^{10} células/kg de peso corporal, preferentemente, 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, lo que incluye todos los valores enteros dentro de esos intervalos. El número de células dependerá del uso final para el que se destina la composición, al igual que el tipo de células incluidas en la misma. Para los usos proporcionados en la presente descripción, las células están generalmente en un volumen de un litro o menos, pueden ser 500 ml o menos, incluso 250 ml o 100 ml o menos. Por tanto, la densidad de las células deseadas es típicamente superior a 10^6 células/ml y generalmente es superior a 10^7 células/ml, generalmente 10^8 células/ml o superior. El número clínicamente relevante de células inmunitarias puede distribuirse en múltiples infusiones que de manera acumulativa igualen o excedan 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} o 10^{12} células. En algunos aspectos, particularmente dado que todas las células infundidas se redirigirán a un antígeno objetivo en particular, pueden administrarse cantidades menores de células, en el intervalo de 10^6 /kilogramo (10^6 - 10^{11} por paciente). Las composiciones de células que expresan CAR pueden administrarse múltiples veces a dosificaciones dentro de estos intervalos. Las células pueden ser alogénicas, singénicas, xenogénicas o autólogas con respecto al paciente sometido a terapia. Si se desea, el tratamiento también puede incluir la administración de mitógenos (por ejemplo, PHA) o linfocinas, citocinas y/o quimiocinas (por ejemplo, IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF-alfa, IL-18, y TNF-beta, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 α , etc.) como se describe en la presente descripción para potenciar la inducción de la respuesta inmunitaria.

Generalmente, las composiciones que comprenden las células activadas y expandidas como se describe en la presente descripción pueden usarse en el tratamiento y prevención de enfermedades que surgen en personas que están inmunodeprimidas. En particular modalidades, las composiciones que comprenden las células T modificadas con CAR contempladas en la presente descripción se usan en el tratamiento del cáncer. Las células T modificadas con CAR pueden administrarse solas, o como una composición farmacéutica en combinación con portadores, diluyentes, excipientes y/o con otros componentes tales como IL-2 u otras citocinas o poblaciones celulares. En modalidades particulares, las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad de células T modificadas genéticamente, en combinación con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden una población de células efectoras inmunitarias que expresan CAR, tales como células T, pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato, y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones se formulan preferentemente para la administración parenteral, por ejemplo, administración intravascular (intravenosa o intraarterial), intraperitoneal o intramuscular.

Las composiciones farmacéuticas líquidas, ya sea si son soluciones, suspensiones u otra forma similar, pueden incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferentemente, solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites no volátiles tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como el solvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples fabricados de vidrio o plástico. Preferentemente, una composición farmacéutica inyectable es estéril.

En una modalidad, las composiciones de células T contempladas en la presente descripción se formulan en un medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones son adecuadas para la administración a sujetos humanos. En modalidades particulares, el medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable es un medio libre de suero.

El medio libre de suero tiene varias ventajas sobre el medio que contiene suero, lo que incluye una composición simplificada y mejor definida, un grado reducido de contaminantes, la eliminación de una fuente potencial de agentes infecciosos, y un menor costo. En diversas modalidades, el medio libre de suero es libre de animales y opcionalmente, puede ser libre de proteínas. Opcionalmente, el medio puede contener proteínas recombinantes biofarmacéuticamente aceptables. Medio "libre de animales" se refiere al medio en donde los componentes se derivan de fuentes no animales. Las proteínas recombinantes reemplazan a las proteínas animales nativas en el medio libre de animales y los nutrientes se obtienen de fuentes sintéticas, vegetales o microbianas. El medio "libre de proteínas", por el contrario, se define como sustancialmente libre de proteínas.

Ejemplos ilustrativos de medios libres de suero usados en composiciones particulares incluyen QBSF-60 (Quality Biological, Inc.), StemPro-34 (Life Technologies) y X-VIVO 10.

En una modalidad preferida, las composiciones que comprenden las células efectoras inmunitarias contempladas en

la presente descripción se formulan en una solución que comprende PlasmaLyte A.

En otra modalidad preferida, las composiciones que comprenden las células efectoras inmunitarias contempladas en la presente descripción se formulan en una solución que comprende un medio de crioconservación. Por ejemplo, pueden usarse medios de crioconservación con agentes de crioconservación para mantener un resultado de alta viabilidad celular después de la descongelación. Ejemplos ilustrativos de medios de crioconservación usados en composiciones particulares incluyen CryoStor CS10, CryoStor CS5 y CryoStor CS2.

En una modalidad más preferida, las composiciones que comprenden las células efectoras inmunitarias contempladas en la presente descripción se formulan en una solución que comprende una relación PlasmaLyte A/CryoStor CS10 50:50.

En una modalidad particular, las composiciones comprenden una cantidad efectiva de células efectoras inmunitarias que expresan CAR, solas o en combinación con uno o más agentes terapéuticos. Por tanto, las composiciones de células efectoras inmunitarias que expresan CAR pueden administrarse solas o en combinación con otros tratamientos contra el cáncer conocidos, tales como radioterapia, quimioterapia, trasplante, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia fotodinámica, etc. Las composiciones también pueden administrarse en combinación con antibióticos. Dichos agentes terapéuticos pueden aceptarse en la técnica como un tratamiento estándar para un estado de enfermedad en particular como se describe en la presente descripción, tal como un cáncer en particular. Los agentes terapéuticos ilustrativos contemplados en modalidades particulares incluyen citocinas, factores de crecimiento, esteroides, NSAID, DMARD, antiinflamatorios, quimioterapéuticos, radioterapéuticos, anticuerpos terapéuticos u otros agentes activos y auxiliares.

En ciertas modalidades, las composiciones que comprenden las células efectoras inmunitarias que expresan CAR descritas en la presente descripción pueden administrarse junto con cualquier número de agentes quimioterapéuticos. Los ejemplos ilustrativos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, lo que incluye altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, calicheamicina, carabicina, carminomicina, carzinoflina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxilfluridina, encitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedor de ácido fólico tal como ácido frofínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicouona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrino; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicouona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); derivados del ácido retinoico tales como Targretin™ (bexaroteno), Panretin™ (alitretinoína); ONTAK™ (denileucina difitox); esperamicinas; capecitabina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. Se incluyen además en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre los cánceres tales como antiestrógenos, lo que incluye, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Puede usarse una variedad de otros agentes terapéuticos junto con las composiciones descritas en la presente descripción. En una modalidad, la composición que comprende células efectoras inmunitarias que expresan CAR se administra con un agente antiinflamatorio. Los agentes o fármacos antiinflamatorios incluyen esteroides y glucocorticoides (lo que incluye betametasona, budesonida, dexametasona, acetato de hidrocortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), lo que incluye aspirina, ibuprofeno, naproxeno, metotrexato, sulfasalazina, leflunomida, medicamentos anti-TNF, ciclofosfamida y micofenolato.

Otros NSAID ilustrativos se eligen del grupo que consiste en ibuprofeno, naproxeno, naproxeno sódico, inhibidores de Cox-2 tales como VIOXX® (rofecoxib) y CELEBREX® (celecoxib), y sialilatos. Los analgésicos ilustrativos se eligen del grupo que consiste en acetaminofén, oxicodona, tramadol o clorhidrato de proporfeno. Los glucocorticoides ilustrativos se eligen del grupo que consiste en cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona o prednisona. Los modificadores de la respuesta biológica ilustrativos incluyen moléculas dirigidas contra marcadores de la superficie celular (por ejemplo, CD4, CD5, etc.), inhibidores de citocinas, tales como los antagonistas de TNF (por ejemplo, etanercept (ENBREL®), adalimumab (HUMIRA®) e infliximab (REMICADE®), inhibidores de quimocinas e inhibidores de moléculas de adhesión. Los modificadores de la respuesta biológica incluyen anticuerpos monoclonales así como también formas recombinantes de moléculas. Los DMARD ilustrativos incluyen azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina, metotrexato, penicilamina, leflunomida, sulfasalazina, hidroxiquina, oro (oral (auranofina) e intramuscular) y minociclina.

Ejemplos ilustrativos de anticuerpos terapéuticos adecuados para la combinación con las células T modificadas con CAR contempladas en modalidades particulares, incluyen atezolizumab, avelumab, bavituximab, bevacizumab (avastina), bivatuzumab, blinatumomab, conatumumab, crizotinib, daratumumab, duligotumab, dacetuzumab, dalotuzumab, durvalumab, elotuzumab (HuLuc63), gemtuzumab, ibritumomab, indatuximab, inotuzumab, ipilimumab, lorvotuzumab, lucatumumab, milatuzumab, moxetumomab, nivolumab, ocaratuzumab, ofatumumab, pembrolizumab, rituximab, siltuximab, teprotumumab y ublituximab.

En ciertas modalidades, las composiciones descritas en la presente descripción se administran junto con una citocina. Por "citocina", como se usa en la presente, se entiende un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de dichas citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen hormonas del crecimiento, tales como la hormona del crecimiento humano, N-metionil hormona del crecimiento humano, y hormona del crecimiento bovino; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glicoproteínas tales como la hormona foliculoestimulante (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora muleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF-beta; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón alfa, beta, y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, un factor de necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores polipeptídicos, lo que incluye LIF y ligando kit (KL). Como se usa en la presente, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinante, y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

En modalidades particulares, una composición comprende células T-CAR contempladas en la presente descripción que se cultivan en presencia de un inhibidor de PI3K como se contempla en la presente descripción y que expresan uno o más de los siguientes marcadores: CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD127 y HLA-DR pueden aislarse adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. En una modalidad, una composición comprende una subpoblación específica de células T, que expresan uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en i) CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197; ii) CD62L, CD127, CD197, CD38; y iii) CD62L, CD27, CD127 y CD8, se aísla adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. En diversas modalidades, las composiciones no expresan o no expresan sustancialmente uno o más de los siguientes marcadores: CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 y LAG3.

En una modalidad, la expresión de uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD62L, CD127, CD197 y CD38 se aumenta al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces o más, en comparación con una población de células T activadas y expandidas sin un inhibidor de PI3K.

En una modalidad, la expresión de uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD62L, CD127, CD27 y CD8 se aumenta al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces o más, en comparación con una población de células T activadas y expandidas sin un inhibidor de PI3K.

En una modalidad, la expresión de uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 y LAG3 se disminuye al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces o más, en comparación con una población de células T activadas y expandidas con un inhibidor de PI3K.

I. Células y antígenos objetivo

5 En modalidades particulares, se proporcionan células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente redirigidas a una célula objetivo, por ejemplo, célula cancerosa, y que comprenden CAR que tienen un dominio de unión que se une a CD79A en las células objetivo. Como se usa en la presente, el término "cáncer" se refiere generalmente a una clase de enfermedades o afecciones en las que las células anormales se dividen sin control y pueden invadir tejidos cercanos

10 Como se usa en la presente, el término "maligno" se refiere a un cáncer en el que un grupo de células tumorales muestra uno o más de crecimiento descontrolado (es decir, división más allá de los límites normales), invasión (es decir, intrusión y destrucción de tejidos adyacentes) y metástasis (es decir, propagación a otras ubicaciones del cuerpo mediante la linfa o la sangre). Como se usa en la presente, el término "hacer metástasis" se refiere a la propagación del cáncer de una parte del cuerpo a otra. Un tumor formado por células que se han propagado se denomina "tumor metastásico" o "metástasis". El tumor metastásico contiene células que son similares a las del tumor original (primario).

15 Como se usa en la presente, el término "benigno" o "no maligno" se refiere a tumores que pueden crecer más pero que no se extienden a otras partes del cuerpo. Los tumores benignos son autolimitados y típicamente no invaden ni hacen metástasis.

20 Una "célula cancerosa" se refiere a una célula individual de un crecimiento o tejido canceroso. Células cancerosas incluye tanto cánceres sólidos como cánceres líquidos. Un "tumor" o "célula tumoral" se refiere generalmente a una hinchazón o lesión formada por un crecimiento anormal de células, que puede ser benigna, premaligna o maligna. La mayoría de los cánceres forman tumores, pero los cánceres líquidos, por ejemplo, la leucemia, no necesariamente forman tumores. Para aquellos cánceres que forman tumores, se usan indistintamente los términos (célula) cancerosa y (célula) tumoral. La cantidad de un tumor en un individuo es la "carga tumoral", que puede medirse como el número, volumen o peso del tumor.

25 El término "recaída" se refiere al diagnóstico del retorno, o signos y síntomas del retorno, de un cáncer después de un período de mejora o remisión.

30 La "remisión" también se denomina "remisión clínica", e incluye tanto la remisión parcial como la completa. En la remisión parcial han desaparecido algunos, pero no todos, los signos y síntomas del cáncer. En la remisión completa han desaparecido todos los signos y síntomas del cáncer, aunque el cáncer aún puede estar en el cuerpo.

35 "Refractario" se refiere a un cáncer que es resistente, o que no responde, a la terapia con un agente terapéutico en particular. Un cáncer puede ser refractario desde el inicio del tratamiento (es decir, no responde a la exposición inicial al agente terapéutico), o como resultado del desarrollo de resistencia al agente terapéutico, ya sea durante el curso de un primer período de tratamiento o durante un período de tratamiento posterior.

40 En una modalidad, la célula objetivo expresa un antígeno, por ejemplo, un antígeno objetivo que no se encuentra sustancialmente en la superficie de otras células normales (deseadas).

En una modalidad, la célula objetivo es una célula hematopoyética, una célula linfoide o una célula mieloide.

45 En ciertas modalidades, la célula objetivo es parte de la sangre, un tejido linfoide o un tejido mieloide.

En una modalidad particular, la célula objetivo es una célula cancerosa o célula madre cancerosa que expresa CD79A.

50 En una modalidad particular, la célula objetivo es una célula cancerosa líquida o una célula cancerosa hematológica que expresa CD79A.

Ejemplos ilustrativos de cánceres líquidos o cánceres hematológicos que pueden prevenirse, tratarse o mejorarse con las composiciones contempladas en modalidades particulares incluyen: leucemias, linfomas y mieloma múltiple.

55 Ejemplos ilustrativos de células a las que pueden dirigirse los CAR anti-CD79A contemplados en modalidades particulares incluyen las de las siguientes leucemias: leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritroleucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica crónica (CLL) y leucemia mieloide crónica (CML), leucemia mielomonocítica crónica (CMML) y policitemia vera.

60 Ejemplos ilustrativos de células a las que pueden dirigirse las composiciones y métodos contemplados en modalidades particulares incluyen los de los siguientes linfomas: linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin nodular con predominio de linfocitos y linfoma no Hodgkin, lo que incluye linfomas no Hodgkin de células B: linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular, linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico de precursores B y linfoma de células del manto; y linfomas no Hodgkin de células T: micosis fungoide, linfoma anaplásico de células grandes, síndrome de Sézary y linfoma linfoblástico de precursores T.

Ejemplos ilustrativos de células a las que pueden dirigirse las composiciones y métodos contemplados en modalidades particulares incluyen los de los siguientes mielomas múltiples: mieloma múltiple evidente, mieloma múltiple indolente (MGUS), leucemia de células plasmáticas, mieloma no secretor, mieloma IgD, mieloma osteoesclerótico, plasmocitoma solitario del hueso y plasmocitoma extramedular.

5 En modalidades preferidas, la célula objetivo que expresa CD79A es una célula cancerosa de DLBCL.

J. Métodos terapéuticos

10 Las células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente contempladas en la presente descripción proporcionan métodos mejorados de inmunoterapia adoptiva para su uso en la prevención, el tratamiento y la mejora de cánceres que expresan CD79A o para prevenir, tratar o mejorar al menos un síntoma asociado con un cáncer que expresa CD79A.

15 En diversas modalidades, las células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente contempladas en la presente descripción proporcionan métodos mejorados de inmunoterapia adoptiva para su uso en el aumento de la citotoxicidad en células cancerosas que expresan CD79A en un sujeto, o para su uso en la disminución del número de células cancerosas que expresan CD79A en un sujeto.

20 En modalidades particulares, la especificidad de una célula efectora inmunitaria primaria se redirige a las células que expresan CD79A, por ejemplo, células cancerosas, mediante la modificación genética de la célula efectora inmunitaria primaria con un CAR contemplado en la presente descripción. En diversas modalidades, se usa un vector viral para modificar genéticamente una célula efectora inmunitaria con un polinucleótido en particular que codifica un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno anti-CD79A que se une a un polipéptido CD79A; un dominio bisagra; un dominio transmembrana (TM), un enlazador oligo o polipeptídico corto, que une el dominio TM al dominio de señalización intracelular del CAR; y uno o más dominios de señalización coestimuladores intracelulares; y un dominio de señalización primario.

30 En una modalidad, se proporciona un tipo de terapia celular donde las células T se modifican genéticamente para expresar un CAR anti-CD79A que se dirige a las células cancerosas que expresan CD79A, y la célula T-CAR se infunde a un receptor que lo necesita. La célula infundida es capaz de destruir las células que provocan la enfermedad en el receptor. A diferencia de las terapias con anticuerpos, las células T-CAR son capaces de replicarse in vivo, lo que da como resultado una persistencia a largo plazo que puede conducir a una terapia contra el cáncer sostenida.

35 En una modalidad, las células T-CAR anti-CD79A pueden experimentar una expansión robusta de células T in vivo y pueden persistir durante una cantidad de tiempo prolongada. En otra modalidad, las células T-CAR anti-CD79A evolucionan hacia células T de memoria específicas o células madre T de memoria que pueden reactivarse para inhibir cualquier formación o crecimiento tumoral adicional.

40 En modalidades particulares, las composiciones que comprenden las células efectoras inmunitarias que comprenden los CAR contemplados en la presente descripción se usan en el tratamiento de afecciones asociadas con células cancerosas o células madre cancerosas que expresan CD79A.

45 Ejemplos ilustrativos de afecciones que pueden tratarse, prevenirse o mejorarse mediante el uso de células efectoras inmunitarias que comprenden los CAR contemplados en modalidades particulares

En una modalidad particular, las composiciones que comprenden las células T modificadas con CAR contempladas en la presente descripción se usan en el tratamiento de cánceres líquidos o hematológicos.

50 En ciertas modalidades, el cáncer líquido o hematológico se selecciona del grupo que consiste en: leucemias, linfomas y mielomas múltiples.

55 En ciertas modalidades, el cáncer líquido o hematológico se selecciona del grupo que consiste en: leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), mieloblástico, promielocítico, mielomonocítico, monocítico, eritroleucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica crónica (CLL), y leucemia mieloide crónica (CML), leucemia mielomonocítica crónica (CMML) y policitemia vera, linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin con predominio de linfocitos nodular, linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico de precursores B, linfoma de células del manto, linfoma de zona marginal, micosis fungoide, linfoma anaplásico de células grandes, síndrome de Sézary, linfoma linfoblástico de precursores T, mieloma múltiple, mieloma múltiple evidente, mieloma múltiple indolente, leucemia de células plasmáticas, mieloma no secretor, mieloma IgD, mieloma osteoesclerótico, plasmocitoma solitario del hueso, y plasmocitoma extramedular.

60 En ciertas modalidades, el cáncer líquido o hematológico se selecciona del grupo que consiste en: leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas (HCL), mieloma múltiple (MM), leucemia mieloide aguda (AML) o leucemia mieloide crónica (CML).

65

En modalidades preferidas, el cáncer líquido o hematológico es DLBCL.

En modalidades preferidas, el cáncer líquido o hematológico es DLBCL en recaída/refractario.

5 En modalidades particulares, se proporcionan métodos que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de las células efectoras inmunitarias que expresan CAR anti-CD79A contempladas en la presente descripción o una composición que comprende las mismas, a un paciente que lo necesita, sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos. En ciertas modalidades, las células se usan en el tratamiento de pacientes en riesgo de desarrollar una afección asociada con células cancerosas que expresan CD79A. Por tanto, en modalidades
10 particulares, métodos para el tratamiento o prevención o mejora de al menos un síntoma de cáncer que comprenden administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente efectiva de las células modificadas con CAR contempladas en la presente descripción.

15 Como se usa en la presente, los términos "individuo" y "sujeto" se usan con frecuencia indistintamente y se refieren a cualquier animal que exhibe un síntoma de una enfermedad, trastorno, o afección que puede tratarse con los vectores de terapia génica, agentes terapéuticos basados en células, y métodos contemplados en otra parte en la presente descripción. En modalidades preferidas, un sujeto incluye cualquier animal que muestra síntomas de una enfermedad, trastorno, o afección relacionada con el cáncer que puede tratarse con los vectores de terapia génica, agentes terapéuticos basados en células, y métodos contemplados en otra parte en la presente descripción. Los sujetos
20 adecuados (por ejemplo, pacientes) incluyen animales de laboratorio (tales como ratones, ratas, conejos o cobayos), animales de granja, y animales domésticos o mascotas (tales como un gato o perro). Se incluyen los primates no humanos y, preferentemente, los pacientes humanos. Los sujetos típicos incluyen pacientes humanos que tienen un cáncer que expresa CD79A, se han diagnosticado con un cáncer que expresa CD79A, o están en riesgo o tienen un cáncer que expresa CD79A, por ejemplo, DLBCL.

25 Como se usa en la presente, el término "paciente" se refiere a un sujeto que se ha diagnosticado con una enfermedad, trastorno o afección en particular que puede tratarse con los vectores de terapia génica, agentes terapéuticos basados en células y métodos descritos en otra parte en la presente descripción.

30 Como se usa en la presente, "tratamiento" o "tratar", incluye cualquier efecto beneficioso o conveniente sobre los síntomas o patología de una enfermedad o afección patológica, y puede incluir incluso reducciones mínimas en uno o más marcadores cuantificables de la enfermedad o afección que se trata. El tratamiento puede implicar opcionalmente la reducción de la enfermedad o afección, o el retraso de la progresión de la enfermedad o afección. "Tratamiento" no indica necesariamente la erradicación completa o la cura de la enfermedad o afección, o de los síntomas asociados a
35 esta.

40 Como se usa en la presente, "prevenir", y palabras similares tales como "prevenido", "prevención", etc., indican un enfoque para prevenir, inhibir o reducir la posibilidad de la aparición o recurrencia de una enfermedad o afección. Se refiere además a retrasar la aparición o recurrencia de una enfermedad o afección o retrasar la aparición o recurrencia de los síntomas de una enfermedad o afección. Como se usa en la presente, "prevención" y palabras similares también incluyen reducir la intensidad, efecto, síntomas y/o carga de una enfermedad o afección antes del inicio o recurrencia de la enfermedad o afección.

45 Como se usa en la presente, la frase "mejorar al menos un síntoma de" se refiere a disminuir uno o más síntomas de la enfermedad o afección para la cual se trata al sujeto. En modalidades particulares, la enfermedad o afección que se trata es un cáncer, en donde el uno o más síntomas mejorados incluyen debilidad, fatiga, falta de aliento, tendencia a desarrollar hematomas y hemorragias, infecciones frecuentes, ganglios linfáticos agrandados, abdomen distendido o doloroso (debido a órganos abdominales agrandados), dolor óseo o articular, fracturas, pérdida de peso no planificada, inapetencia, sudoraciones nocturnas, fiebre leve persistente y disminución de la micción (debido a función
50 renal deficiente).

Por "potenciar" o "promover", o "aumentar" o "expandir" se refiere generalmente a la capacidad de una composición contemplada en la presente descripción, por ejemplo, una célula T modificada genéticamente o vector que codifica un CAR, para producir, inducir o provocar una mayor respuesta fisiológica (es decir, efectos aguas abajo) en comparación
55 con la respuesta provocada por un vehículo o una molécula/composición de control. Una respuesta fisiológica cuantificable puede incluir un aumento en la expansión, activación, persistencia de las células T y/o un aumento en la capacidad de destrucción de células cancerosas, entre otras evidentes a partir de la comprensión en la técnica y la descripción en la presente descripción. Una cantidad "aumentada" o "potenciada" es típicamente una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir un aumento que es 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (lo que incluye todos los números enteros y puntos decimales entre ellos y por encima de 1, por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la respuesta producida por el vehículo o una composición de control.

65 Por "disminuir" o "bajar", o "atenuar", o "reducir", o "abatir" se refiere generalmente a la capacidad de la composición contemplada en la presente descripción para producir, inducir o provocar una respuesta fisiológica menor (es decir, efectos aguas abajo) en comparación con la respuesta provocada por el vehículo o una molécula/composición de

control. Una cantidad "disminuida" o "reducida" es típicamente una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir una disminución que es 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (lo que incluye todos los números enteros y puntos decimales entre ellos y por encima de 1, por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la respuesta (respuesta de referencia) producida por el vehículo, una composición de control, o la respuesta en un linaje celular en particular.

Por "mantiene", o "conserva", o "mantenimiento", o "sin cambio", o "sin cambio sustancial", o "sin disminución sustancial" se refiere generalmente a la capacidad de una composición contemplada en la presente descripción para producir, inducir o provocar una respuesta fisiológica similar (es decir, efectos aguas abajo) en una célula, en comparación con la respuesta provocada por cualquiera de los vehículos, una molécula/composición de control, o la respuesta en un linaje celular en particular. Una respuesta comparable es la que no es diferente significativamente o diferente de manera cuantificable de la respuesta de referencia.

En una modalidad, un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita comprende administrar una cantidad efectiva, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende las células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente contempladas en la presente descripción. La cantidad y frecuencia de la administración se determinará mediante factores tales como la condición del paciente, y el tipo y la gravedad de la enfermedad del paciente, aunque pueden determinarse las dosificaciones adecuadas mediante ensayos clínicos.

En una modalidad, la cantidad de células efectoras inmunitarias, por ejemplo, células T, en la composición administrada a un sujeto es al menos $0,1 \times 10^5$ células, al menos $0,5 \times 10^5$ células, al menos 1×10^5 células, al menos 5×10^5 células, al menos 1×10^6 células, al menos $0,5 \times 10^7$ células, al menos 1×10^7 células, al menos $0,5 \times 10^8$ células, al menos 1×10^8 células, al menos $0,5 \times 10^9$ células, al menos 1×10^9 células, al menos 2×10^9 células, al menos 3×10^9 células, al menos 4×10^9 células, al menos 5×10^9 células, o al menos 1×10^{10} células.

En modalidades particulares, se administran a un sujeto aproximadamente 1×10^7 células T a aproximadamente 1×10^9 células T, aproximadamente 2×10^7 células T a aproximadamente $0,9 \times 10^9$ células T, aproximadamente 3×10^7 células T a aproximadamente $0,8 \times 10^9$ células T, aproximadamente 4×10^7 células T a aproximadamente $0,7 \times 10^9$ células T, aproximadamente 5×10^7 células T a aproximadamente $0,6 \times 10^9$ células T, o aproximadamente 5×10^7 células T a aproximadamente $0,5 \times 10^9$ células T.

En una modalidad, la cantidad de células efectoras inmunitarias, por ejemplo, células T, en la composición administrada a un sujeto es al menos $0,1 \times 10^4$ células/kg de peso corporal, al menos $0,5 \times 10^4$ células/kg de peso corporal, al menos 1×10^4 células/kg de peso corporal, al menos 5×10^4 células/kg de peso corporal, al menos 1×10^5 células/kg de peso corporal, al menos $0,5 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, al menos 1×10^6 células/kg de peso corporal, al menos $0,5 \times 10^7$ células/kg de peso corporal, al menos 1×10^7 células/kg de peso corporal, al menos $0,5 \times 10^8$ células/kg de peso corporal, al menos 1×10^8 células/kg de peso corporal, al menos 2×10^8 células/kg de peso corporal, al menos 3×10^8 células/kg de peso corporal, al menos 4×10^8 células/kg de peso corporal, al menos 5×10^8 células/kg de peso corporal, o al menos 1×10^9 células/kg de peso corporal.

En modalidades particulares, se administran a un sujeto aproximadamente 1×10^6 células T/kg de peso corporal a aproximadamente 1×10^8 células T/kg de peso corporal, aproximadamente 2×10^6 células T/kg de peso corporal a aproximadamente $0,9 \times 10^8$ células T/kg de peso corporal, aproximadamente 3×10^6 células T/kg de peso corporal a aproximadamente $0,8 \times 10^8$ células T/kg de peso corporal, aproximadamente 4×10^6 células T/kg de peso corporal a aproximadamente $0,7 \times 10^8$ células T/kg de peso corporal, aproximadamente 5×10^6 células T/kg de peso corporal a aproximadamente $0,6 \times 10^8$ células T/kg de peso corporal, o aproximadamente 5×10^6 células T/kg de peso corporal a aproximadamente $0,5 \times 10^8$ células T/kg de peso corporal.

Un experto en la técnica reconocería que pueden necesitarse múltiples administraciones de las composiciones contempladas en la presente descripción para efectuar la terapia deseada. Por ejemplo, una composición puede administrarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más veces durante un intervalo de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años, 10 años o más.

En ciertas modalidades, puede ser conveniente administrar a un sujeto células efectoras inmunitarias activadas y después subsecuentemente volver a extraer sangre (o realizar una aféresis), activar células efectoras inmunitarias a partir de ellas y volver a infundir al paciente estas células efectoras inmunitarias activadas y expandidas. Este proceso puede llevarse a cabo varias veces cada pocas semanas. En ciertas modalidades, las células efectoras inmunitarias pueden activarse a partir de extracciones de sangre de 10 cc a 400 cc. En ciertas modalidades, las células efectoras inmunitarias se activan a partir de extracciones de sangre de 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc, 100 cc, 150 cc, 200 cc, 250 cc, 300 cc, 350 cc o 400 cc o más. Sin limitarse por la teoría, el uso de este protocolo de múltiples extracciones de sangre/múltiples reinfusiones puede servir para seleccionar ciertas poblaciones de células efectoras inmunitarias.

La administración de las composiciones contempladas en la presente descripción puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, lo que incluye mediante inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. En una modalidad preferida, las composiciones se administran por vía parenteral. Las frases

"administración parenteral" y "administrada parenteralmente", como se usan en la presente, se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, usualmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravascular, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intratumoral, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutáneo, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal e intraesternal. En una modalidad, las composiciones contempladas en la presente descripción se administran a un sujeto por inyección directa en un tumor, ganglio linfático o sitio de infección.

En una modalidad, a un sujeto que lo necesita se le administra una cantidad efectiva de una composición para aumentar una respuesta inmunitaria celular a una afección relacionada con las células B en el sujeto. La respuesta inmunitaria puede incluir respuestas inmunitarias celulares mediadas por células T citotóxicas capaces de destruir las células infectadas, células T reguladoras y respuestas de células T cooperadoras. También pueden inducirse respuestas inmunitarias humorales, mediadas principalmente por células T cooperadoras capaces de activar células B, lo que conduce por tanto a la producción de anticuerpos. Pueden usarse una variedad de técnicas para analizar el tipo de respuestas inmunitarias inducidas por las composiciones, que están bien descritas en la técnica; por ejemplo, Current Protocols in Immunology, Editado por: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.

En el caso de la destrucción mediada por células T, la unión CAR-ligando inicia la señalización de CAR a la célula T, lo que da como resultado la activación de una variedad de vías de señalización de células T que inducen a la célula T a producir o liberar proteínas capaces de inducir la apoptosis de células objetivo mediante diversos mecanismos. Estos mecanismos mediados por células T incluyen la transferencia de gránulos citotóxicos intracelulares desde la célula T hacia la célula objetivo, la secreción por las células T de citocinas proinflamatorias que pueden inducir directamente la destrucción de las células objetivo (o indirectamente mediante el reclutamiento de otras células efectoras asesinas) y la regulación positiva de los ligandos del receptor de muerte (por ejemplo, FasL) en la superficie de células T que inducen la apoptosis de las células objetivo después de la unión a su receptor de muerte cognado (por ejemplo, Fas) en la célula objetivo.

En una modalidad, se proporciona un método para tratar a un sujeto diagnosticado con un cáncer que expresa CD79A, que comprende extraer células efectoras inmunitarias de un sujeto diagnosticado con un cáncer que expresa CD79A, modificar genéticamente dichas células efectoras inmunitarias con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un CAR contemplado en la presente descripción, produciendo de esta manera una población de células efectoras inmunitarias modificadas y administrar la población de células efectoras inmunitarias modificadas al mismo sujeto. En una modalidad preferida, las células efectoras inmunitarias comprenden células T.

En ciertas modalidades, se proporcionan métodos para estimular una respuesta moduladora inmunitaria mediada por células efectoras inmunitarias a una población de células objetivo en un sujeto, que comprenden las etapas de administrar al sujeto una población de células efectoras inmunitarias que expresan un constructo de ácido nucleico que codifica una molécula CAR.

Los métodos para administrar las composiciones celulares contempladas en modalidades particulares incluyen cualquier método que sea efectivo para dar como resultado la reintroducción de células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente ex vivo que expresan directamente un CAR en el sujeto o la reintroducción de las progenitoras modificadas genéticamente de células efectoras inmunitarias que al introducirse en un sujeto se diferencian en células efectoras inmunitarias maduras que expresan el CAR. Un método comprende transducir células T de sangre periférica ex vivo con un constructo de ácido nucleico contemplado en la presente descripción y retornar las células transducidas al sujeto.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción de car anti-CD79A

Se diseñaron anticuerpos scFv anti-CD79A humanizados que contienen CAR para contener un promotor de MND unido operativamente a scFv anti-CD79A, un dominio bisagra y transmembrana de CD8 α y un dominio coestimulador de CD137 seguido del dominio de señalización intracelular de la cadena CD3 ζ . Los CAR anti-CD79A comprenden una secuencia del péptido señal (SP) CD8 α para la expresión superficial en células efectoras inmunitarias. La Tabla 3 muestra la identidad, referencia de Genbank, nombre de origen y cita para los diversos segmentos de nucleótidos de un vector lentiviral de CAR anti-CD79A ilustrativo. Las secuencias de polipéptidos CAR anti-CD79A ilustrativas se exponen en las SEQ ID NO: 25-30 y las secuencias de polinucleótidos CAR anti-CD79A ilustrativas se exponen en las SEQ ID NO: 31-36.

Tabla 3.

	Nucleótidos	Identidad	Referencia de GenBank	Nombre de origen	Cita
5	1-185	Cadena principal del plásmido pUC19	Acceso #L09137.2 nt 1 - 185	pUC19	New England Biolabs
	185-222	Enlazador	No aplicable	Sintético	No aplicable
	223-800	CMV	No aplicable	pHCMV	(1994) PNAS 91: 9564-68
10	801-1136	R, U5, PBS y secuencias de empaque	Acceso #M19921.2 nt 454-789	pNL4-3	Maldarelli, y otros (1991) J Virol: 65(11):5732-43
15	1137-1139	Codón de inicio de gag (ATG) cambiado a codón de parada (TAG)	No aplicable	Sintético	No aplicable
	1140-1240	Secuencia gag de VIH-1	Acceso #M19921.2 nt 793-	pNL4-3	Maldarelli, y otros (1991) J Virol:
20	1241-1243	Secuencia gag de VIH-1 cambiada a un segundo	No aplicable	Sintético	No aplicable
	1244-1595	Secuencia gag de VIH-1	Acceso #M19921.2 nt 897-1248	pNL4-3	Maldarelli, y otros (1991) J Virol: 65(11):5732-43
25	1596-1992	cPPT/CTS pol de VIH-1	Acceso #M19921.2 nt 4745-5125	pNL4-3	Maldarelli, y otros (1991) J Virol: 65(11):5732-43
30	1993-2517	HIV-1, región env aislado HXB3 (RRE)	Acceso #M14100.1 nt 1875-2399	PgTAT-CMV	Malim, M. H. Nature (1988) 335: 181-183
	2518-2693	Secuencias env HIV-1 S/A	Acceso #M19921.2 nt 8290-8470	pNL4-3	Maldarelli, y otros (1991) J Virol: 65(11):5732-43
35	2694-2708	Enlazador	No aplicable	Sintético	No aplicable
	2709-3096	MNDU3	No aplicable	rSPA.mPro.M ND	Haas y otros Journal of Virology. 2003;77(17):
40	3097-3125	Enlazador	No aplicable	Sintético	No aplicable
	3126-3188	Péptido señal variable	No aplicable	Sintético	No aplicable
		scFv anti-CD79A	No aplicable	Sintético	No aplicable
45	3927-3935	Enlazador	No aplicable	Sintético	No aplicable
	3936-4142	Bisagra y TM CD8a	Acceso # NM_001768	Sintético	Milone y otros (2009) Mol Ther
50	4143-4268	Dominio de señalización CD137 (4-1BB)	Acceso # NM_001561	Sintético	Milone y otros (2009) Mol Ther 17(8): 1453-64
	4269-4607	Dominio de señalización CD3- ζ	Acceso # NM_000734	Sintético	Milone y otros (2009) Mol Ther 17(8): 1453-64
55	Nucleótidos	Identidad	Referencia de GenBank	Nombre de origen	Cita
60	4608-4718	ppt y parte de U3 de VIH-1	Acceso #M19921.2 nt 9005-9110	pNL4-3	Maldarelli, y otros (1991) J Virol: 65(11):5732-43
	4719-4835	Parte de U3 (delección de 399 pb) y R de HIV-1	Acceso #M19921.2 nt 9511-9627	pNL4-3	Maldarelli, y otros (1991) J Virol: 65(11):5732-43
65	4836-4859	PoliA sintética	No aplicable	Sintético	Levitt, N. Genes & Dev (1989) 3:1019-1025

4860-4878	Enlazador	No aplicable	Sintético	No aplicable ¹
4879-7351	Cadena principal de pUC19	Acceso #L09137.2 nt 2636-2686	pUC19	New England Biolabs (Adjunto)

5

Ejemplo 2

Evaluación de células T-CAR anti-CD79A humanas

10 Se evaluaron receptores de antígenos quiméricos (CAR) específicos de CD79A (por ejemplo, las SEQ ID NO: 26, 27, 29 y 30) para determinar la expresión de CAR y la actividad biológica contra las células que expresan CD79A.

Expresión del antígeno objetivo

15 En un experimento, se examinaron células objetivo Daudi, células K562, células Pfeiffer para determinar la expresión de CD79A mediante el uso de anticuerpos anti-CD79A. Las células se incubaron con anticuerpo anti-CD79A y se evaluó la expresión mediante citometría de flujo. La expresión de CD79A no fue detectable en las células K562, se expresó moderadamente en las células Pfeiffer y se expresó altamente en las células Daudi. Figura 1A.

20 En otro experimento, se midió la expresión de CD79A en células objetivo Pfeiffer, Daudi, NU-DUL-1 y SU-DHL-2 mediante el uso de anticuerpos anti-CD79A. Las células se incubaron con anticuerpo anti-CD79A y se evaluó la expresión mediante un citómetro de flujo. La expresión de CD79A fue de nuevo más alta en células Daudi, después progresivamente menor en células NU-DUL-1, SU-DHL-2 y Pfeiffer. Figura 2A.

25 Expresión de CAR anti-CD79A

Las células T-CAR se produjeron mediante el uso de un sistema directamente escalable a grandes procesos de fabricación clínica. Brevemente, se cultivaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en medios que contenían IL-2 (CellGenix) y anticuerpos específicos para CD3 y CD28 (Miltenyi Biotec). Se añadieron lentivirus que codifican CAR anti-CD79A un día después del inicio del cultivo. Las células T-CAR anti-CD79A se mantuvieron en fase logarítmica mediante la adición de medio fresco que contenía IL-2 durante un total de diez días de cultivo. Al final del cultivo, se examinaron las células T-CAR anti-CD79A para determinar la expresión mediante el uso de citometría de flujo. En un experimento, las células T humanas primarias manipuladas con lentivirus que expresan CAR anti-CD79A se tñieron con conjugado de cabra anti-ratón (GaM) a biotina y se detectaron con estreptavidina conjugada con PE. Figura 1B. En otro experimento, se evaluó la expresión de CAR anti-CD79A en células T mediante tinción con cabra anti-ratón (GaM) y se evaluó la unión del antígeno CD79A soluble a células T-CAR anti-CD79A mediante la tinción con una proteína de fusión Fc-dominio extracelular CD79a marcada con ficoeritrina (PE). Figura 2B. Estos reactivos identificaron específicamente las células T que expresan CAR anti-CD79A.

40 Actividad dependiente del antígeno de células T-CAR anti-CD79A

En un experimento, se evaluó la actividad biológica de células T-CAR anti-CD79A a las líneas celulares positivas a CD79A (Pfeiffer y Daudi) y negativas a CD79A (K562) mediante el uso de un ensayo de liberación de interferón-gamma (IFN γ). Las células T-CAR anti-CD79A se cultivaron conjuntamente en ausencia de células objetivo o con células K562 (CD79A-), células Pfeiffer (bajo contenido de CD79A) y células Daudi (alto contenido de CD79A) durante 24 horas. Las células T-CAR anti-CD79A liberaron IFN γ solo en presencia de líneas celulares positivas para CD79A. Figura 1C.

50 En otro experimento, se evaluó la actividad biológica de las células T-CAR anti-CD79A a líneas celulares positivas para CD79A (Huh7.CD79A, Daudi, NU-DUL-1, SU-DHL-2 y Pfeiffer) y negativas para CD79A (Huh7) mediante el uso de un ensayo de liberación de interferón-gamma (IFN γ). Las células T-CAR anti-CD79A se cultivaron conjuntamente en ausencia de células objetivo (células T solas) o con células Huh7 (CD79A-), células Huh7.CD79a (CD79A+), células Daudi (CD79A+), NU-DUL-1 (CD79A+), SU-DHL-2 (CD79A+) o células Pfeiffer (CD79A+). Figura 2C.

55

REIVINDICACIONES

1. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende:
 - 5 a) un dominio extracelular que comprende un anticuerpo anti-CD79A o un fragmento de unión a antígeno de este que se une a uno o más epítomos de un polipéptido CD79A humano, en donde el anticuerpo anti-CD79A o fragmento de unión a antígeno de este comprende
 - 10 i) una secuencia de la cadena ligera variable que comprende las secuencias de CDRL1-CDRL3 expuestas en las SEQ ID NO: 1-3 y una secuencia de la cadena pesada variable que comprende las secuencias de CDRH1-CDRH3 expuestas en las SEQ ID NO: 4-6; o
 - 15 ii) una secuencia de la cadena ligera variable que comprende las secuencias de CDRL1-CDRL3 expuestas en las SEQ ID NO: 9-11 y una secuencia de la cadena pesada variable que comprende las secuencias de CDRH1-CDRH3 expuestas en las SEQ ID NO: 12-14; o
 - 20 iii) una secuencia de la cadena ligera variable que comprende las secuencias de CDRL1-CDRL3 expuestas en las SEQ ID NO: 17-19 y una secuencia de la cadena pesada variable que comprende las secuencias de CDRH1-CDRH3 expuestas en las SEQ ID NO: 20-22;
 - 20 b) un dominio transmembrana;
 - c) uno o más dominios de señalización coestimuladores intracelulares; y
 - d) un dominio de señalización primario.
2. El CAR de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti-CD79A o fragmento de unión a antígeno que se une al polipéptido CD79A humano se selecciona del grupo que consiste en: un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un dímero Fab biespecífico (Fab₂), un trímero Fab trispecífico (Fab₃), un Fv, una proteína Fv de cadena única ("scFv"), un bis-scFv, (scFv)₂, un minicuerpo, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, una proteína Fv estabilizada con disulfuro ("dsFv").
3. El CAR de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo anti-CD79A o fragmento de unión a antígeno que se une al polipéptido CD79A humano es un scFv.
4. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo anti-CD79A o fragmento de unión a antígeno de este comprende una secuencia de la cadena ligera variable como se expone en la SEQ ID NO: 7, 15 o 23; y/o una secuencia de la cadena pesada variable como se expone en la SEQ ID NO: 8, 16 o 24.
5. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el dominio transmembrana se aísla de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: cadena alfa o beta del receptor de células T, CD δ , CD3 ϵ , CD γ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD154 y PD1.
6. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el dominio transmembrana se aísla de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: CD8 α , CD28, CD4, CD45, PD1 y CD152.
7. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el dominio transmembrana se aísla de CD8 α .
8. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el uno o más dominios de señalización coestimuladores se aíslan de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C, SLP76, TRIM y ZAP70.
9. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el uno o más dominios de señalización coestimuladores se aíslan de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CD28, CD134 y CD137.
10. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el uno o más dominios de señalización coestimuladores se aísla de CD137.
11. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el dominio de señalización primario se aísla de un CD3 ζ .
12. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además un polipéptido de la región bisagra.

ES 2 977 415 T3

13. El CAR de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el polipéptido de la región bisagra comprende una región bisagra de CD8 α .
14. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende además una región espaciadora.
15. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 25 a 30.

5

10

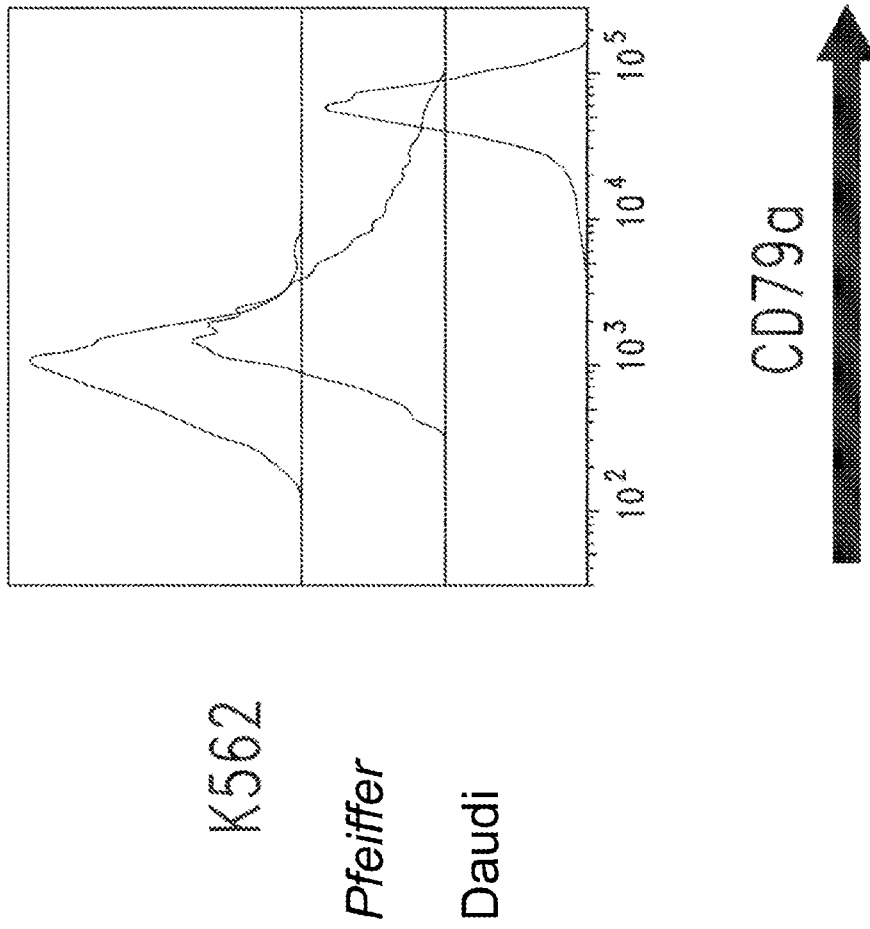


Figura 1A

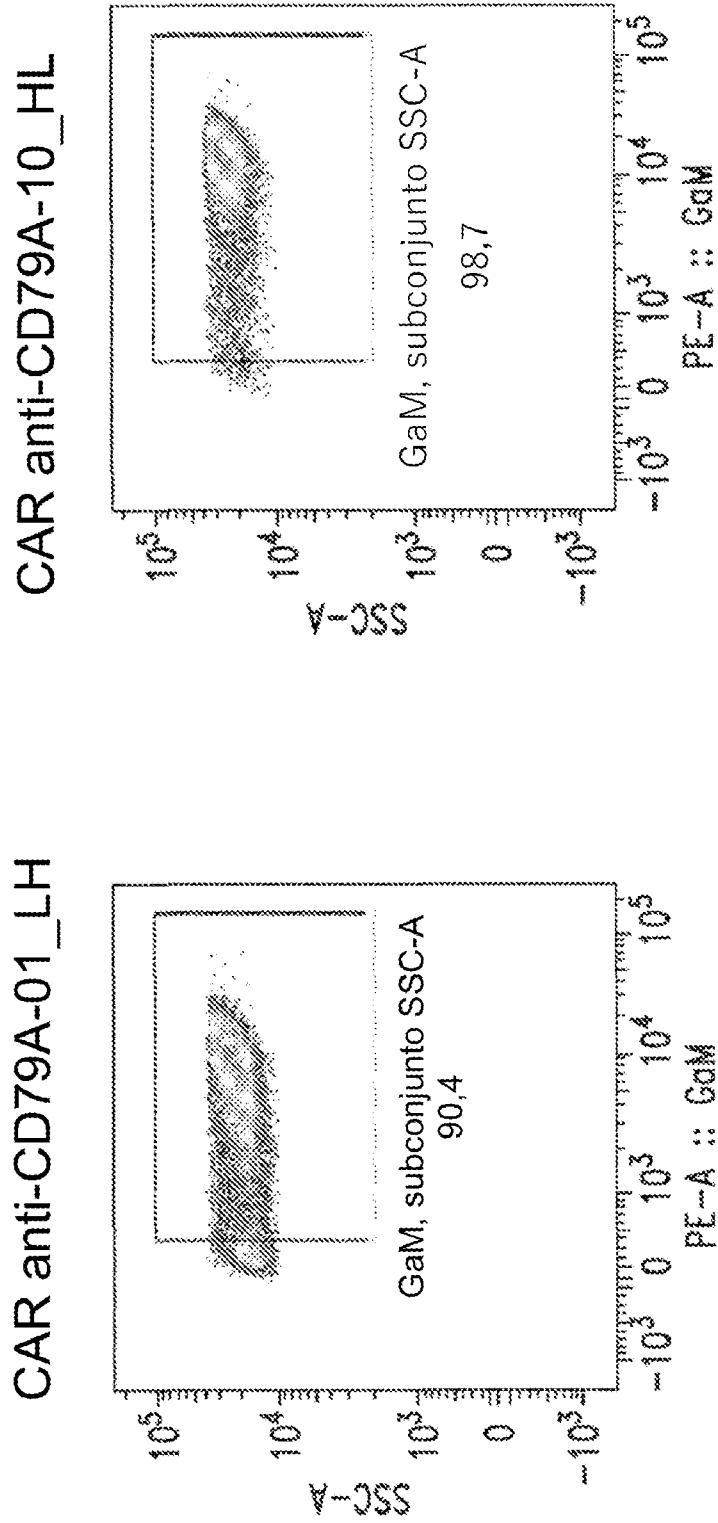


Figura 1B

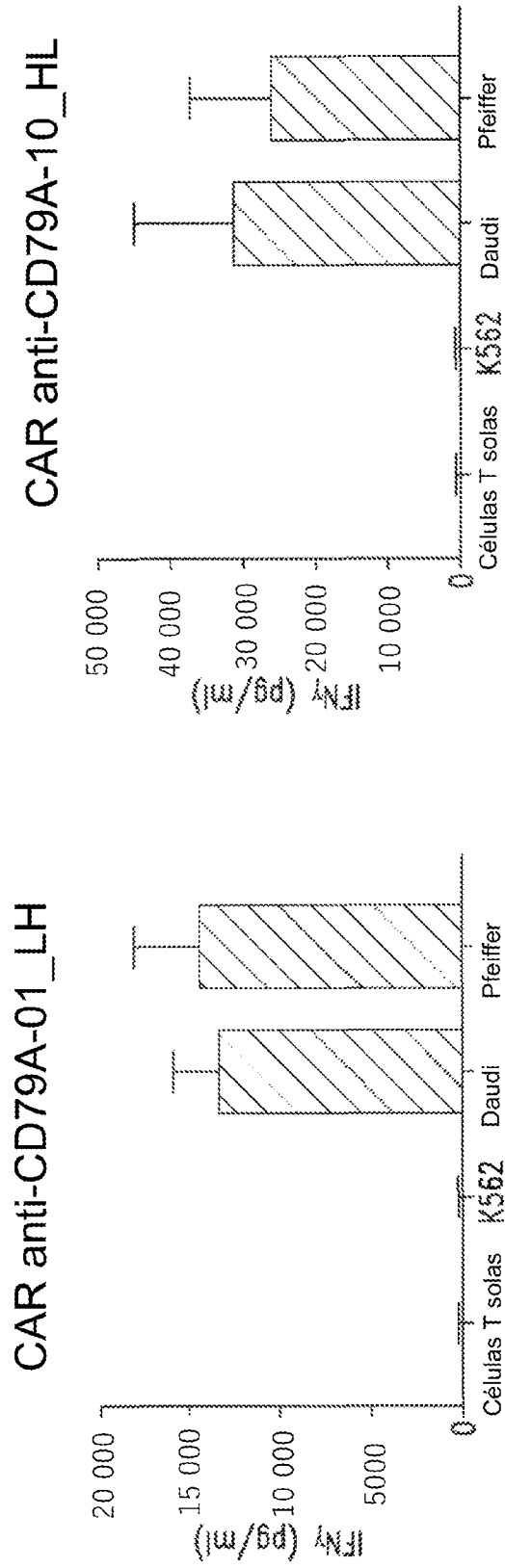


Figura 1C

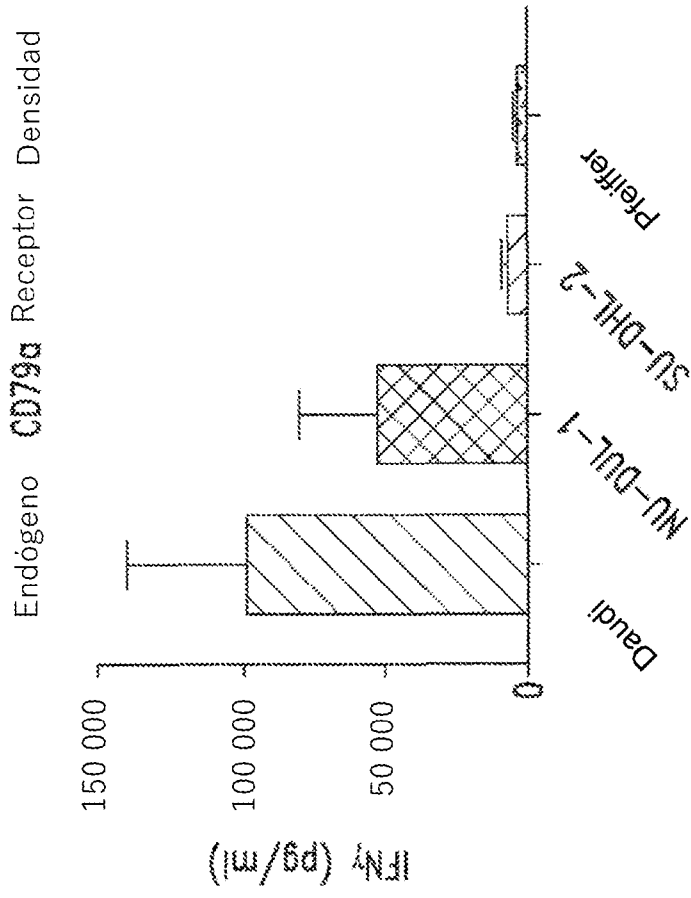
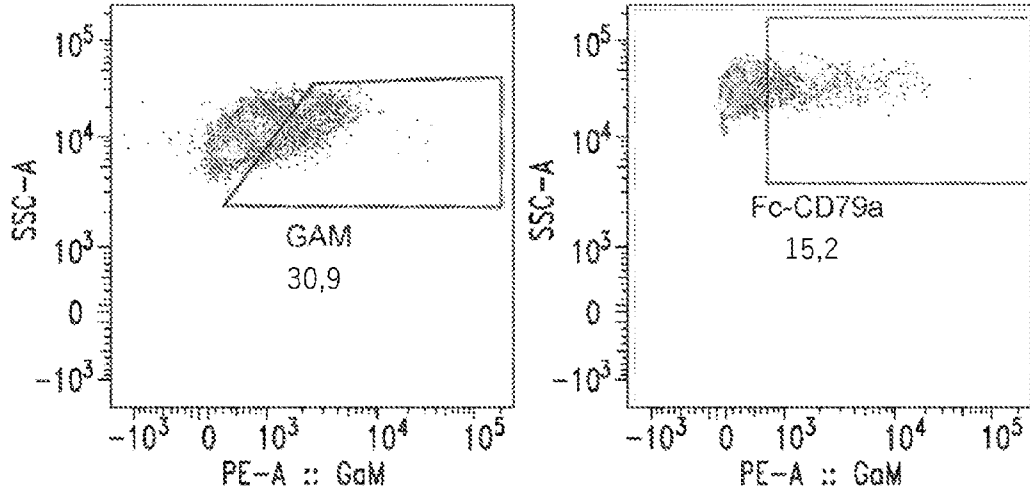


Figura 2A

CAR anti-CD79A-02_HL



CAR anti-CD79A-20_LH

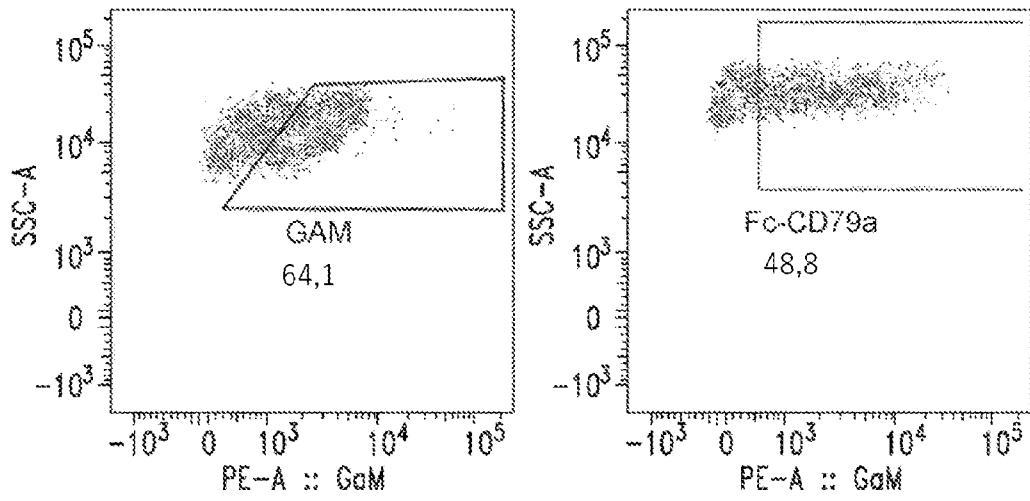
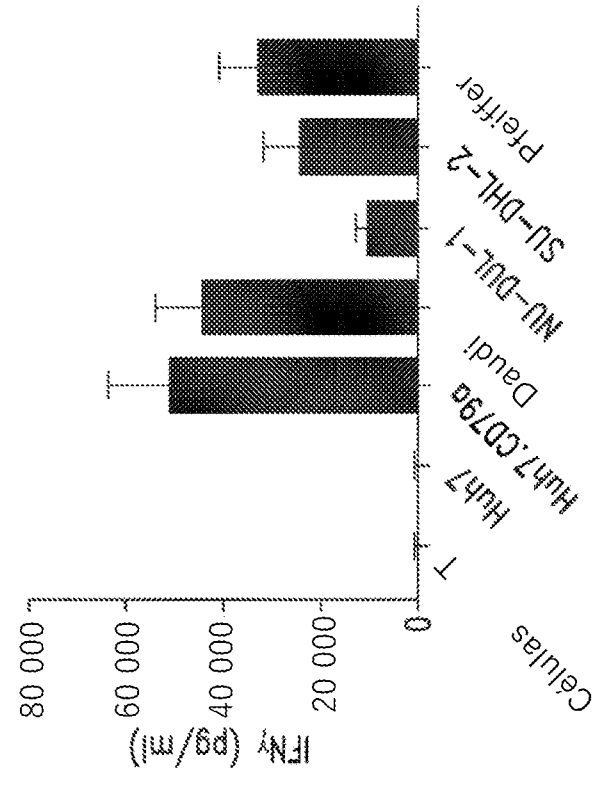


Figura 2B

CAR anti-CD79A-20_LH



CAR anti-CD79A-02_HL

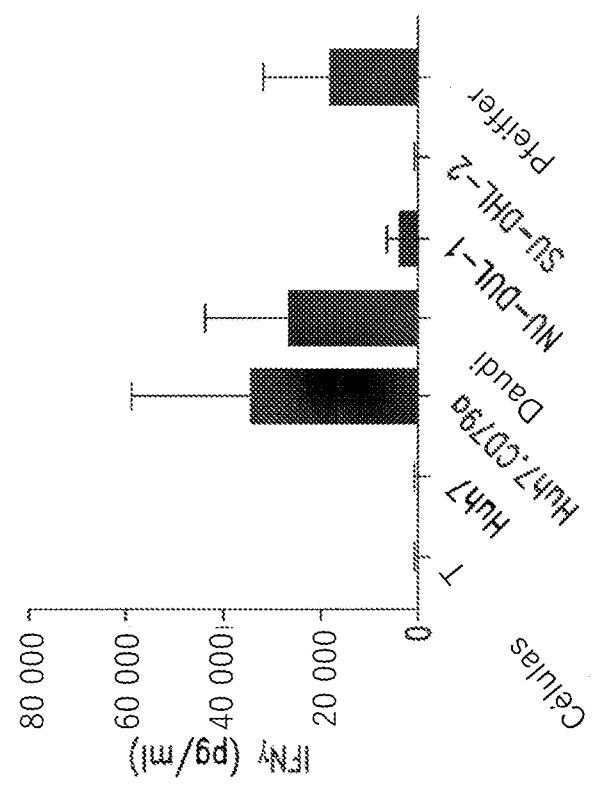


Figura 2C