

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 959 443**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01)
C12N 15/85	(2006.01)
C07K 14/725	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61P 37/04	(2006.01)
A61P 43/00	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.02.2013 PCT/US2013/027361**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013 WO13126729**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2013 E 13751899 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2023 EP 2817331**

54 Título: **Uso del dominio de señalización de CD2 en receptores de antígenos quiméricos de segunda generación**

30 Prioridad:

22.02.2012 US 201261601907 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.02.2024

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (100.0%)
3600 Civic Center Boulevard, 9th Floor
Philadelphia PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

**JUNE, CARL H.;
SCHOLLER, JOHN y
POSEY, AVERY, D.**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 959 443 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

Uso del dominio de señalización de CD2 en receptores de antígenos quiméricos de segunda generación

La presente solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud provisional de Estados Unidos n.º de serie 61/601.907, presentada el 22 de febrero de 2012.

Antecedentes de la invención

5 Los linfocitos T modificados con receptores de antígenos quiméricos (Chimeric-Antigen Receptors, CAR) que llevan el dominio de señalización de CD3-zeta presentan niveles moderados de citólisis del tumor diana y cantidades bajas de producción de citocinas. La incorporación de dominios de señalización coestimuladores, generalmente el de CD28 o 4-1BB, en los CAR de segunda generación aumenta significativamente la destrucción de células diana y la producción de citocinas. Se ha demostrado que la ligadura de la molécula CD2 natural dio como resultado 10 diferencias cuantitativas y cualitativas en comparación con la transducción de señales de calcio inducida por TCR. Informes recientes demostraron que la ligadura del receptor CD2 endógeno aumenta significativamente la IL-2 producida a partir de linfocitos T con CAR de primera generación.

15 Los datos actuales indican que los linfocitos T CAR necesitan injertarse y sobrevivir en pacientes que tienen respuestas tumorales clínicamente beneficiosas (Porter *et al.*, 2011, N Engl J Med, 365:725-33). Sin embargo, la muerte de linfocitos T inducida por la activación puede ocurrir cuando se alcanza el umbral para demasiada transducción de señales (Viola *et al.*, 1996, Science, 273(5271): 104-6; Ren-Heidenreich *et al.*, 2002, Cancer Immunol Immunother, 2002:417-23; Bachmann *et al.*, 1996, Eur J Immunol, 26(9):2017-22; Ren-Heidenreich *et al.*, 2001, Curr Gene Ther, 1(3):253-5; Borthwick *et al.*, 1996, Immunology, (4):508-15). Cheadle, E.J. *et al.*, "Ligation of the CD2 co-stimulatory receptor enhances IL-2 production from first-generation chimeric antigen receptor T cells", Gene Therapy, vol. 19, n.º 11, páginas 1114-1120, divulgan un CAR que lleva el endodominio CD2. 20

Por tanto, existe una necesidad urgente en la técnica de composiciones de CAR que regulen las respuestas de los linfocitos T para mejorar la supervivencia de los linfocitos T CAR y proporcionar un entorno beneficioso para la actividad antitumoral. La presente invención aborda esta necesidad. 25

Sumario de la invención

30 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La invención proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización de CD3 zeta, en donde la región de señalización coestimuladora comprende un dominio de señalización de CD2 y comprende además el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28. 35

En una divulgación, el CAR comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1.

En una realización, el dominio de unión a antígeno es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En una realización el fragmento de unión a antígeno es un Fab o un scFv. En una realización, el dominio de unión a antígeno se une a un antígeno tumoral. En una realización, el antígeno tumoral está asociado con una neoplasia hematológica. En una realización, el antígeno tumoral está asociado con un tumor sólido. En una realización, el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, glucolípido F77, EGFRvIII, GD-2, TCR de NY-ESO-1, TCR de MAGE A3 y cualquier combinación de los mismos. 40

En una divulgación, la región de señalización coestimuladora comprende además el dominio intracelular de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83 y cualquier combinación de los mismos. 45

La invención también proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR) aislado que comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización de CD3 zeta, en donde la región de señalización coestimuladora comprende un dominio de señalización de CD2 y comprende además el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28. 50

La invención también proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización de CD3 zeta, en donde la región de señalización coestimuladora comprende un dominio de señalización de CD2 y comprende además el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28. 55 60

La invención también proporciona un linfocito T que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un

receptor de antígeno quimérico (CAR), el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización de CD3 zeta, en donde el dominio de señalización coestimulador comprende un dominio de señalización de CD2 y comprende además el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28.

5 En una realización, el linfocito T se selecciona del grupo que consiste en un linfocito T, un linfocito T citotóxico (Cytotoxic T Lymphocyte, CTL) y un linfocito T regulador. En una divulgación adicional, la célula es un linfocito citolítico natural (Natural Killer, NK).

10 En una realización, la célula presenta una inmunidad antitumoral cuando el dominio de unión a antígeno se une a su antígeno correspondiente.

La invención también proporciona un linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR para usar en un método de terapia de una enfermedad, en donde el método comprende estimular una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T a una población celular o tejido diana en un mamífero, comprendiendo el método administrar a un mamífero una cantidad eficaz del linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora que comprende un dominio de señalización de CD2 y el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28 y un dominio de señalización de CD3 zeta y en donde el dominio de unión a antígeno se selecciona para reconocer específicamente la población celular o tejido diana.

15

20

La invención también proporciona un linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR para usar en un método de tratamiento de un tumor en un mamífero, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad eficaz de un linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora que comprende un dominio de señalización de CD2 y el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28 y un dominio de señalización de CD3 zeta, proporcionando así una inmunidad antitumoral en el mamífero.

25

La invención también proporciona un linfocito T modificado genéticamente para usar en un método para tratar una enfermedad, trastorno o afección que es cáncer en un mamífero, en donde la enfermedad, trastorno o afección se asocia con una expresión elevada de un antígeno tumoral, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad eficaz de un linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora que comprende un dominio de señalización de CD2 y el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28 y un dominio de señalización de CD3 zeta, tratando así el mamífero.

30

35

En una realización, el linfocito T es un linfocito T autólogo.

La invención proporciona un linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR para usar en un método para tratar cáncer, en donde el método comprende administrar a un ser humano con cáncer el linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora que comprende un dominio de señalización de CD2 y el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28 y un dominio de señalización de CD3 zeta.

40

45 En una realización, el ser humano es resistente a al menos un agente quimioterapéutico.

La invención proporciona un linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR para usar en un método para tratar cáncer, en donde el método comprende generar una población persistente de linfocitos T modificados genéticamente en un ser humano diagnosticado con cáncer, en donde el linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR se administra al ser humano, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora que comprende un dominio de señalización de CD2 y el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28 y un dominio de señalización de CD3 zeta, en donde la población persistente de linfocitos T genéticamente modificados persiste en el ser humano durante al menos un mes después de la administración.

50

55

En una realización, la población persistente de linfocitos T genéticamente modificados comprende al menos una célula seleccionada del grupo que consiste en un linfocito T que se administró al ser humano, una progenie de un linfocito T que se administró al ser humano y una combinación de los mismos.

60 En una realización, la población persistente de linfocitos T genéticamente modificados comprende un linfocito T de memoria.

En una realización, el cáncer es leucemia linfocítica crónica. En una realización, la leucemia linfocítica crónica es leucemia CD19+ refractaria y linfoma.

65 En una realización, la población persistente de linfocitos T genéticamente modificados persiste en el ser humano

durante al menos tres meses después de la administración.

5 En una realización, la población persistente de linfocitos T genéticamente modificados persiste en el ser humano durante al menos cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, dos años o tres años después de la administración.

En una realización, el cáncer se trata, como se define en las reivindicaciones.

10 La invención proporciona un linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR para usar en un método para tratar cáncer, en donde el método comprende expandir una población de linfocitos T modificados genéticamente en un ser humano diagnosticado con cáncer, en donde el linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR se administra al ser humano, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora que comprende un dominio de señalización de CD2 y el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28 y un dominio de señalización de CD3 zeta, en donde el linfocito T modificado genéticamente administrado produce una población de linfocitos T de progenie en el ser humano.

En una realización, los linfocitos T de la progenie en el ser humano comprenden un linfocito T de memoria.

20 En una realización, el linfocito T es un linfocito T autólogo.

En una realización, el ser humano es resistente a al menos un agente quimioterapéutico.

25 La invención incluye un método *in vitro* para reducir la cantidad de citocina secretada por un linfocito T, comprendiendo dicho método la modificación por ingeniería genética del linfocito T para expresar un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de dominio coestimulador que comprende un dominio de señalización de CD2 y el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28 y un dominio de señalización de CD3 zeta.

30 En una realización, la reducción de la cantidad de citocina secretada por un linfocito T reduce la proliferación de linfocitos T reguladores.

35 La invención incluye un método *in vitro* para reducir la cantidad de entrada de calcio inducida por la activación en un linfocito T, comprendiendo dicho método la modificación por ingeniería genética del linfocito T para expresar un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de dominio coestimulador que comprende un dominio de señalización de CD2 y el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28 y un dominio de señalización de CD3 zeta.

40 En una realización, la reducción de la cantidad de entrada de calcio inducida por la activación en un linfocito T impide la muerte celular del linfocito T inducida por la activación.

Breve descripción de los dibujos

45 La siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención se entenderá mejor cuando se lea junto con los dibujos adjuntos. A fin de ilustrar la invención, se muestran en los dibujos las realizaciones que se prefieren actualmente. Debe entenderse que, sin embargo, la invención no está limitada a las disposiciones precisas e instrumentos de las realizaciones mostradas en los dibujos. La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

50 La Figura 1 representa la secuencia de nucleótidos para el CAR antiCD19-CD2zeta (SEQ ID NO: 1).

55 La Figura 2 muestra los resultados de experimentos ilustrativos que demuestran que los linfocitos T se activan y proliferan a partir de señales CD3/CD2. Se estimularon linfocitos T CD4 y CD8 normales de donantes humanos con perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos α CD2 (T11.1 y T11.2), α CD3 (OKT3) y α CD28 (9.3). El número absoluto de células y las duplicaciones de la población demuestran la proliferación celular. El tamaño celular representa el estado de activación de la célula. La activación mediante señales de CD2/CD3 induce suficientemente la activación y la proliferación celular.

60 La Figura 3 representa los resultados de experimentos ilustrativos que demuestran que los CAR CD2 liberan citocinas características de una respuesta inmunitaria eficaz. Se cultivaron conjuntamente linfocitos T normales de donantes humanos electroporados con ARNm de CAR durante 24 horas con células tumorales diana y se midió la secreción de citocinas. IL-2 e IFN- γ aumentan en SS1CD2z, similar a SS128z (arriba). Sin embargo, La señal de CD2 disminuye la secreción de citocinas en SS128CD2z. El CAR CD19CD2z produce cantidades similares de IL-2 e IFN-g en comparación con CD19z y CD1928z.

65 La Figura 4 muestra los resultados de experimentos ilustrativos que demuestran que los CAR con el dominio de

señalización de CD2 son eficaces para destruir células tumorales. Se cultivaron conjuntamente linfocitos T normales de donantes humanos, electroporados con ARNm de CAR, con células tumorales diana durante 18 horas (izquierda) y 4 horas (derecha) en relaciones de efector:diana variables. Los CAR CD2 eliminan eficazmente las células tumorales en ambos ensayos, CAR comparables con dominios de señalización de CD3z o CD28z.

5 La Figura 5 representa los resultados de un experimento ilustrativo que demuestra que el dominio de señalización de CD2 mejora la proliferación de linfocitos T cuando los linfocitos T normales de donantes humanos electroporados con CAR se cultivaron conjuntamente con células tumorales diana durante 5 días.

10 No hay diferencia significativa en el número de linfocitos T con CAR CD2 a los 3 días de estimulación, pero hay un aumento del doble en el número de linfocitos T con CAR CD2 después de 5 días, lo que sugiere que el dominio de señalización de CD2 contribuye a una mayor proliferación de linfocitos T cuando se añade a un CAR.

15 La Figura 6 muestra los resultados de un experimento ilustrativo que demuestra la respuesta del flujo de calcio de linfocitos T con CAR con los dominios de señalización de CD28, CD2, CD137 además del dominio de CD3zeta. Se cargaron linfocitos T normales de donantes humanos electroporados con ARNm de CAR con indicador de calcio Indo-1 AM y se estimularon con proteína de fusión mesotelina-Fc 30 segundos después del inicio del registro. Se muestran las relaciones de calcio unido (Indo-1 violeta) respecto a calcio libre (Indo-1 azul) a lo largo del tiempo. Las adiciones del dominio de señalización de CD2 a SS1z aumentan la señal de flujo de calcio, pero no tan fuerte como el flujo de calcio de SS128z.

Descripción detallada

25 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La invención se refiere a composiciones y a composiciones para usar en métodos para tratar el cáncer, incluyendo, aunque no de forma limitativa, neoplasias hematológicas y tumores sólidos. La presente invención se refiere a una estrategia de transferencia celular adoptiva de linfocitos T modificados para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR). Los CAR son moléculas que combinan la especificidad basada en anticuerpos para un antígeno deseado (por ejemplo, antígeno tumoral) con un dominio intracelular que activa el receptor de linfocitos T para generar una proteína quimérica que presenta una actividad inmunitaria celular antitumoral específica.

30 La presente invención proporciona la incorporación de CD2 en un CAR para alterar la producción de citocinas de los linfocitos T, que se manipulan genéticamente para expresar el CAR que comprende CD2. Como se analiza en otra parte en el presente documento, CD2 se puede incorporar a un CAR para regular negativa y positivamente la producción de citocinas de los linfocitos T. Por tanto, el uso de CD2 en un CAR puede alterar la supervivencia de los linfocitos T CAR y los umbrales de muerte celular inducida por la activación.

35 En una realización, la invención proporciona un método *in vitro* para reducir la cantidad de citocina secretada por un linfocito T, comprendiendo dicho método la modificación por ingeniería genética del linfocito T para expresar un CAR en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de dominio coestimulador que comprende un dominio de señalización de CD2 y el dominio intracelular de un módulo coestimulador de CD28 y un dominio de señalización de CD3 zeta.

40 En otra realización, la invención proporciona un método *in vitro* para reducir la cantidad de entrada de calcio inducida por la activación en un linfocito T, comprendiendo dicho método la modificación por ingeniería genética del linfocito T para expresar un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de dominio coestimulador que comprende un dominio de señalización de CD2 y el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28 y un dominio de señalización de CD3 zeta.

45 La presente invención se refiere en general al uso de linfocitos T modificados genéticamente para expresar de forma estable un CAR deseado. Los linfocitos T que expresan un CAR se denominan en el presente documento linfocitos T CAR o linfocitos T modificados con CAR. Preferentemente, la célula se puede modificar genéticamente para expresar de forma estable un dominio de unión a anticuerpo en su superficie, lo que confiere una especificidad de antígeno novedosa que es independiente del MHC. En algunos casos, el linfocito T se modifica genéticamente para expresar de forma estable un CAR que combina un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico con un dominio intracelular de la cadena CD3-zeta o proteína FcγRI en una sola proteína quimérica.

50 En una realización, el CAR de la invención comprende un dominio extracelular que tiene un dominio de reconocimiento de antígeno, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático, como se define en las reivindicaciones. En una realización, se utiliza el dominio transmembrana que se asocia de forma natural a uno de los dominios en el CAR. En otra realización, el dominio transmembrana se puede seleccionar o modificar mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de tales dominios a los dominios transmembrana de las mismas o de diferentes proteínas de superficie de la membrana con el fin de minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor. Preferentemente, el dominio transmembrana es el dominio de bisagra CD8α.

65 El dominio citoplasmático del CAR se diseña para que comprenda además los dominios de señalización de CD3-

zeta. El dominio citoplasmático del CAR comprende los módulos de señalización de CD3-zeta, CD2 y CD28, como se define en las reivindicaciones. Por consiguiente, la invención proporciona linfocitos T CAR y métodos para usar para terapia adoptiva.

5 En una realización, los linfocitos T CAR de la invención se pueden generar mediante la introducción de un vector lentivírico que comprende el CAR deseado, por ejemplo, un CAR que comprende anti-CD19, dominio transmembrana y bisagra CD8 α y dominios de señalización de CD2 y CD3zeta humanos, en las células. En una realización, los linfocitos T CAR de la invención son capaces de replicarse *in vivo* dando como resultado una persistencia a largo plazo que puede llevar a un control tumoral sostenido.

10 En otra realización, los linfocitos T con CAR de la invención se pueden generar mediante la transfección de un ARN que codifica el CAR deseado, por ejemplo, un CAR que comprende anti-CD19, dominio transmembrana y bisagra Cd8 α y dominios de señalización de CD2 y CD3-zeta humanos, en las células. En una realización, el CAR se expresa transitoriamente en los linfocitos T genéticamente modificados con CAR.

15 En una realización, la invención se refiere a un linfocito T modificado genéticamente que expresa un CAR para usar en el tratamiento de un paciente que tiene cáncer o que está en riesgo de tener cáncer usando una infusión de linfocitos como se define en las reivindicaciones. Preferentemente, la infusión de linfocitos autólogos se usa en el tratamiento. Las PBMC autólogas se recogen de un paciente que necesita tratamiento y los linfocitos T se activan y expanden usando los métodos descritos en el presente documento y conocidos en la técnica y a continuación, se infunden nuevamente en el paciente.

25 En una realización, la invención se refiere a linfocitos T modificados genéticamente que expresan un CAR para usar en un método de tratamiento de un paciente con cáncer como se define en las reivindicaciones. La presente invención se basa en el hallazgo de que la inclusión del dominio de señalización de CD2 dentro del dominio citoplasmático de un CAR influye significativamente en la producción de citocinas y en la señalización de calcio en los linfocitos T CAR modificados. En una divulgación, la inclusión del dominio de señalización de CD2 aumenta la producción de citocinas. En otra realización, la inclusión del dominio de señalización de CD2 reduce la producción de citocinas. Por tanto, el dominio de señalización de CD2 dentro del dominio citoplasmático de un CAR, solo o junto con otros dominios de señalización citoplasmática, regula positiva y negativamente la producción de citocinas en el sitio del tumor. En otra realización, el dominio de señalización de CD2 dentro de un CAR reduce la entrada de calcio, como se define en las reivindicaciones, previniendo así la muerte celular inducida por la activación del CAR modificado genéticamente.

35 En otra realización adicional, la invención se refiere en general a linfocitos T para usar en un método de tratamiento de un paciente con riesgo de desarrollar cáncer. El método también incluye el tratamiento de una malignidad o una enfermedad autoinmunitaria en la que la quimioterapia y/o la inmunoterapia en un paciente da(n) como resultado una inmunosupresión significativa en el paciente, aumentando así el riesgo de que el paciente desarrolle cáncer.

40 La invención incluye el uso de linfocitos T que expresan un CAR anti-CD19, incluyendo tanto CD3-zeta como el dominio coestimulador CD2 (también conocidos como linfocitos T CAR 19). En una realización, los linfocitos T que expresan CAR 19 de la invención pueden experimentar una expansión robusta *in vivo* y se pueden establecer células de memoria específicas de antígeno que persisten en niveles altos durante un período prolongado en la sangre y en la médula ósea. En algunos casos, los linfocitos T CAR 19 para usar en un método de acuerdo con la invención, el método que comprende la infusión en un paciente, pueden eliminar las células de leucemia *en vivo* en pacientes con LLC avanzada resistente a la quimioterapia. Sin embargo, la invención no se limita a linfocitos T CAR 19. Más bien, la invención incluye cualquier dominio de unión a antígeno (por ejemplo, anti-mesotelina) fusionado con los siguientes dominios intracelulares: un dominio de señalización de CD2, un dominio de señalización de CD28 y un dominio de señal de CD3zeta, como se define en las reivindicaciones.

50 Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica para el ensayo de la presente invención, se describen en el presente documento los materiales y métodos preferentes. Al describir y reivindicar la presente invención, se utilizará la siguiente terminología.

60 También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es únicamente con el fin de describir realizaciones particulares y no se pretende que sea limitante.

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

"Aproximadamente", como se usa en el presente documento, cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferentemente $\pm 5\%$, incluso más preferentemente $\pm 1\%$ y aún más preferentemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que dichas variaciones son adecuadas para realizar los métodos divulgados.

5 "Activación", como se utiliza en el presente documento, se refiere al estado de un linfocito T que se ha estimulado suficientemente para inducir una proliferación celular detectable. La activación también puede estar asociada con la producción inducida de citocinas y funciones efectoras detectables.

10 La expresión "linfocitos T activados" se refiere, entre otras cosas, a los linfocitos T que están en división celular.

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

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab', F(ab')₂ y fragmentos Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos scFv y anticuerpos
20 multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Una "cadena pesada de anticuerpo", como se utiliza en el presente documento, se refiere al mayor de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en todas las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones de origen natural.

30 Una "cadena ligera de anticuerpo", como se utiliza en el presente documento, se refiere al menor de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en todas las moléculas de anticuerpo en sus configuraciones de origen natural, las cadenas ligeras κ y λ se refieren a los dos isotipos principales de cadena ligera de los anticuerpos.

Por la expresión "anticuerpo sintético", como se usa en el presente documento, se entiende un anticuerpo que se genera usando tecnología de ADN recombinante, tal como, por ejemplo, un anticuerpo expresado por un bacteriófago como se describe en el presente documento. La expresión también debe interpretarse en el sentido de un anticuerpo que se ha generado por la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo y cuya molécula de ADN expresa una proteína de anticuerpo o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, en donde la secuencia de ADN o de aminoácidos se ha obtenido usando tecnología de ADN sintético o de secuencia
40 de aminoácidos que está disponible y es bien conocida en la técnica.

El término "antígeno" o "Ag", como se usa en el presente documento, se define como una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar la producción de anticuerpos o la activación de células inmunológicamente competentes específicas o de ambas. El experto en la materia comprenderá que cualquier macromolécula, incluyendo virtualmente todas las proteínas o péptidos, puede servir como un antígeno. Además, los antígenos pueden proceder de ADN recombinante o genómico. Un experto en la materia comprenderá que cualquier ADN, que comprende una secuencia de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos parcial que codifica una proteína que provoca una respuesta inmunitaria, por lo tanto, codifica un "antígeno" como se usa ese término en el presente documento. Además, un experto en la materia comprenderá que no es necesario que un antígeno esté codificado únicamente por una secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen. Resulta evidente que la presente invención incluye, pero no se limita a, el uso de secuencias de nucleótidos parciales de más de un gen y que estas secuencias de nucleótidos se disponen en diversas combinaciones para obtener la respuesta inmunitaria deseada. Por otra parte, un experto en la materia comprenderá que un antígeno no necesita ser codificado por un "gen" en absoluto. Es evidente que un antígeno puede generarse, sintetizarse o que puede derivarse de una muestra biológica. Tal muestra biológica puede incluir, pero no se limita a una muestra de tejido, una muestra de tumor, una célula o un fluido biológico.

La expresión "efecto antitumoral", como se usa en el presente documento, se refiere a un efecto biológico que puede manifestarse por una disminución en el volumen del tumor, una disminución en el número de células tumorales, una disminución en el número de metástasis, un aumento en la expectativa de vida o una mejoría de diversos síntomas fisiológicos asociados con la condición cancerosa. Un "efecto antitumoral" también se puede manifestar mediante la capacidad de los péptidos, polinucleótidos, células y anticuerpos de la invención en la prevención de la aparición de tumores en primer lugar.

65 El término "autoantígeno" significa, de acuerdo con la presente invención, cualquier autoantígeno que el sistema inmunitario reconozca erróneamente como extraño. Los autoantígenos comprenden, pero sin limitación, proteínas

celulares, fosfoproteínas, proteínas de la superficie celular, lípidos celulares, ácidos nucleicos, glucoproteínas, incluyendo receptores de superficie celular.

5 La expresión "enfermedad autoinmunitaria", como se usa en el presente documento, se define como un trastorno que resulta de una respuesta autoinmunitaria. Una enfermedad autoinmunitaria es el resultado de una respuesta inapropiada y excesiva a un autoantígeno. Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, hepatitis autoinmunitaria, parotiditis autoinmunitaria, enfermedad de Crohn, diabetes (Tipo I), epidermólisis ampollosa distrófica, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia grave, pénfigo vulgar, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, espondiloartropatías, tiroiditis, vasculitis, vitíligo, mixedema, anemia perniciosa, colitis ulcerosa, entre otros.

15 Como se utiliza en el presente documento, se entiende que el término "autólogo" se refiere a cualquier material derivado del mismo individuo al que luego se va a reintroducir en el individuo.

"Alogénico" se refiere a un injerto procedente de un animal diferente de la misma especie.

20 "Xenogénico" se refiere a un injerto procedente de un animal de una especie diferente.

El término "cáncer", como se usa en el presente documento, se define como una enfermedad caracterizada por el crecimiento rápido e incontrolado de células aberrantes. Las células cancerosas pueden diseminarse localmente o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. Los ejemplos de diversos tipos de cáncer incluyen, pero sin limitación, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervicouterino, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer cerebral, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y similares.

30 El "ligando coestimulador", como se usa el término en el presente documento, incluye una molécula en una célula presentadora de antígeno (por ejemplo, una aAPC, célula dendrítica, linfocito B y similares) que se une específicamente a una molécula coestimuladora en un linfocito T, proporcionando de este modo una señal que, además de la señal primaria proporcionada mediante, por ejemplo, la unión de un complejo de TCR/CD3 con una molécula del MHC cargada con péptido, media en una respuesta de linfocitos T, incluyendo, aunque no de forma limitativa, proliferación, activación, diferenciación y similares. Un ligando coestimulador puede incluir, pero no se limita a, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulador inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor de linfotóxina beta, 3/TR6, FLT3, ILT4, HVEM, un agonista o anticuerpo que se une con el receptor de ligando Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3. Un ligando coestimulador también abarca, entre otros, un anticuerpo que se une específicamente con una molécula coestimuladora presente en un linfocito T, tal como, aunque no de forma limitativa, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83.

45 Una "molécula coestimuladora" se refiere al compañero de unión afín en un linfocito T que se une específicamente con un ligando coestimulador, mediando de este modo una respuesta coestimulante mediante el linfocito T, tal como, aunque no de forma limitativa, proliferación. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero sin limitación, una molécula del MHC de clase I, BTLA y un receptor de ligando Toll.

50 Una "señal coestimuladora", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una señal, que, en combinación con una señal primaria, tal como la unión de TCR/CD3, conduce a la proliferación de linfocitos T y/o aumento o disminución de moléculas clave.

Una "enfermedad" es un estado de salud de un animal en donde el animal no puede mantener la homeostasis y en donde si la enfermedad no mejora, la salud del animal continúa deteriorándose. En cambio, un "trastorno" en un animal es un estado de salud en el que el animal puede mantener la homeostasis, pero en el que el estado de salud del animal es menos favorable de lo que sería en ausencia del trastorno. Si se deja sin tratar, un trastorno no necesariamente causa una disminución adicional en el estado de salud del animal.

Una "cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, significa una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico o profiláctico.

60 "Codificante" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de los mismos. Por tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm correspondiente a ese gen producen la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia del ARNm y que generalmente se proporciona en las listas de secuencias y la cadena no codificante,

utilizada como molde para la transcripción de un gen o ADNc, se pueden denominar codificantes de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

5 Como se usa en el presente documento, "endógeno" se refiere a cualquier material de o producido dentro de un organismo, célula, tejido o sistema.

Como se utiliza en el presente documento, el término "exógeno" se refiere a cualquier material introducido o producido fuera de un organismo, célula, tejido o sistema.

10 El término "expresión", como se usa en el presente documento, se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos particular dirigida por su promotor.

15 "Vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de expresión unidas operativamente a una secuencia de nucleótidos a expresar. Un vector de expresión comprende suficientes elementos de acción *cis* para la expresión; pueden suministrarse otros elementos para la expresión por la célula hospedadora o en un sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus (por ejemplo, lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.

20 "Homólogo" se refiere a la similitud de secuencia o identidad de secuencia entre dos polipéptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. Cuando una posición en ambas secuencias comparadas está ocupada por la misma base o subunidad de monómero de aminoácido, por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. El porcentaje de homología entre dos secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las dos secuencias divididas por el número de posiciones comparadas X 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias son coincidentes u homólogas, entonces las dos secuencias son un 60 % homólogas. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN ATTGCC y TATGGC comparten un 50 % de homología. Generalmente, se hace una comparación cuando dos secuencias se alinean para proporcionar la máxima homología.

30 El término "inmunoglobulina" o "Ig", como se usa en el presente documento, se define como una clase de proteínas, que funcionan como anticuerpos. Los anticuerpos expresados por los linfocitos B a veces se denominan BCR (receptor de linfocitos B, por sus siglas en inglés) o receptores de antígeno. Los cinco miembros incluidos en esta clase de proteínas son IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. La IgA es el anticuerpo primario que está presente en las secreciones corporales, tales como saliva, lágrimas, leche materna, secreciones gastrointestinales y secreciones de moco de las vías respiratorias y genitourinarias. La IgG es el anticuerpo circulante más común. La IgM es la principal inmunoglobulina producida en la respuesta inmunitaria primaria en la mayoría de los sujetos. Es la inmunoglobulina más eficaz en aglutinación, fijación de complemento y otras respuestas de anticuerpos, y es importante en la defensa contra bacterias y virus. La IgD es la inmunoglobulina que no tiene una función de anticuerpo conocida, pero puede servir como un receptor de antígeno. La IgE es la inmunoglobulina que media la hipersensibilidad inmediata al provocar la liberación de mediadores de los mastocitos y basófilos tras la exposición al alérgeno.

45 Como se utiliza en el presente documento, un "material de formación" incluye una publicación, un registro, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que pueda usarse para comunicar la utilidad de las composiciones y métodos de la invención. El material de formación del kit de la invención puede, por ejemplo, fijarse a un recipiente que contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición de la invención o enviarse junto con un recipiente que contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición. Como alternativa, el material de formación puede enviarse por separado desde el recipiente con la intención de que el material de formación y el compuesto se utilicen cooperativamente por el receptor.

50 "Aislado" significa alterado o eliminado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido naturalmente presente en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico o péptido parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado". Una molécula de ácido nucleico o proteína aislada puede existir en forma sustancialmente purificada o puede existir en un entorno no nativo tal como, por ejemplo, una célula hospedadora.

60 En el ámbito de la presente invención, se usan las siguientes abreviaturas para las bases de ácidos nucleicos habituales. "A" se refiere a adenosina, "C" se refiere a la citosina, "G" se refiere a guanósina, "T" se refiere a timidina y "U" se refiere a uridina.

65 Salvo que se indique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La expresión secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o un ARN también puede incluir intrones en la medida en que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede, en alguna versión, contener uno o más intrones.

Un "lentivirus", como se usa en el presente documento, se refiere a un género de la familia Retroviridae. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus en la capacidad de infectar células que no se dividen; pueden administrar una cantidad significativa de información genética en el ADN de la célula hospedadora, por lo que son uno de los métodos más eficaces de un vector de suministro de genes. El VIH, SIV y FIV son ejemplos de lentivirus. Los vectores procedentes de lentivirus ofrecen los medios para lograr niveles significativos de transferencia génica *in vivo*.

Por el término "modulación", como se utiliza en el presente documento, se entiende la mediación de un aumento o disminución detectables en el nivel de una respuesta en un sujeto en comparación con el nivel de una respuesta en el sujeto en ausencia de un tratamiento o compuesto y/o en comparación con el nivel de una respuesta en un sujeto por lo demás idéntico pero sin tratar. El término abarca perturbar y/o afectar una señal o respuesta natural, por lo tanto, la mediación de una respuesta terapéutica beneficiosa en un sujeto, preferentemente, un ser humano.

Salvo que se indique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

La expresión "unido operativamente" se refiere al enlace funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácido nucleico heteróloga que da como resultado la expresión de esta última. Por ejemplo, una primera secuencia de ácido nucleico se une operativamente con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Generalmente, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y cuando sea necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, están en el mismo marco de lectura.

La expresión antígeno tumoral "sobrexpresado" o "sobrexpresión" del antígeno tumoral está destinada a indicar un nivel anormal de expresión del antígeno tumoral en una célula de un área de enfermedad como un tumor sólido dentro de un tejido u órgano específico del paciente relativo al nivel de expresión en una célula normal de ese tejido u órgano. Los pacientes que tienen tumores sólidos o una neoplasia hematológica caracterizada por la sobrexpresión del antígeno tumoral se pueden determinar mediante ensayos estándar conocidos en la técnica.

La administración "parenteral" de una composición inmunogénica incluye, por ejemplo, inyección subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) o intraesternal o técnicas de infusión.

Los términos "paciente", "sujeto", "individuo", y similares se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a cualquier animal o células del mismo, ya sea *in vitro* o *in situ*, susceptibles de los métodos descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones no limitantes, el paciente, sujeto o individuo es un ser humano.

El término "polinucleótido", como se usa en el presente documento, se define como una cadena de nucleótidos. Además, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. Por tanto, los ácidos nucleicos y los polinucleótidos como se usan en el presente documento son intercambiables. Un experto en la materia tiene el conocimiento general de que los ácidos nucleicos son polinucleótidos, que se pueden hidrolizar en los "nucleótidos" monoméricos. Los nucleótidos monoméricos se pueden hidrolizar en nucleósidos. Como se usa en el presente documento, los polinucleótidos incluyen, pero sin limitación, todas las secuencias de ácido nucleico que se obtienen mediante cualquier medio disponible en la técnica, incluyendo, sin limitación, medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácido nucleico de una biblioteca recombinante o un genoma celular, utilizando tecnología de clonación ordinaria y PCR™ y similares y mediante medios sintéticos.

Como se utiliza en el presente documento, los términos "péptido", "polipéptido", y "proteína" se usan indistintamente y se refieren a un compuesto comprendido por restos de aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos, y no se limita el número máximo de aminoácidos que pueden comprender la secuencia de una proteína o péptido. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprenda dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos.

Como se utiliza en el presente documento, el término se refiere tanto a cadenas cortas, que también se denominan comúnmente en la técnica péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo y a cadenas más largas, que generalmente se denominan en la técnica proteínas, de los cuales hay muchos tipos. Los "polipéptidos" incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Los polipéptidos incluyen péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos o una combinación de los mismos.

El término "promotor", como se usa en el presente documento, se define como una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, necesario para iniciar la transcripción específica de una secuencia de polinucleótidos.

- 5 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "secuencia promotora/reguladora" significa una secuencia de ácido nucleico que se requiere para la expresión de un producto génico unido operativamente a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia del promotor central y en otros casos, esta secuencia también puede incluir una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que se requieren para la expresión del producto génico. La secuencia promotora/reguladora puede, por ejemplo, ser una que exprese el producto génico de una manera específica de tejido.
- 10 Un promotor "constitutivo" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula en la mayoría o en todas las condiciones fisiológicas de la célula.
- 15 Un promotor "inducible" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente solo cuando un inductor que corresponde al promotor está presente en la célula.
- 20 Un promotor "específico de tejido" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente con un polinucleótido codificado o especificado por un gen, hace que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente solo si la célula es una célula del tipo tisular correspondiente al promotor.
- 25 Por la expresión "se une específicamente", como se usa en el presente documento con respecto a un anticuerpo, se entiende un anticuerpo que reconoce un antígeno específico, pero no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas de una muestra. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de una especie también puede unirse a ese antígeno de una o más especies. Pero, dicha reactividad entre especies no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En otro ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno también puede unirse a diferentes formas alélicas del antígeno. Sin embargo, dicha reactividad cruzada no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En algunos casos, las expresiones "unión específica" o "que se une específicamente", se pueden usar en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, para significar que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o epítipo) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura de proteína específica en lugar de a proteínas en general. En caso de que un anticuerpo sea específico para el epítipo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o A libre, no marcado), en una reacción que contiene "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.
- 35 Por el término "estimulación", se refiere a una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimuladora (por ejemplo, un complejo TCR/CD3) con su ligando afin, mediando así un evento de transducción de señal, tal como, aunque no de forma limitativa, transducción de señal a través del complejo TCR/CD3. La estimulación puede mediar en la expresión alterada de ciertas moléculas, tales como la regulación a la baja de TGF- β y/o la reorganización de las estructuras del citoesqueleto y similares.
- 40 Una "molécula estimuladora", como se usa el término en el presente documento, significa una molécula en un linfocito T que se une específicamente con un ligando estimulador afin presente en una célula presentadora de antígeno.
- 45 Un "ligando estimulador", como se utiliza en el presente documento, significa un ligando que cuando está presente en una célula presentadora de antígeno (por ejemplo, una aAPC, una célula dendrítica, un linfocito B y similares) se puede unir específicamente con un compañero de unión afin (denominado en el presente documento "molécula estimuladora") en un linfocito T, mediando de este modo una respuesta primaria mediante el linfocito T, incluyendo, aunque no de forma limitativa, activación, iniciación de una respuesta inmunitaria, proliferación y similares. Los ligandos estimuladores son bien conocidos en la técnica y abarcan, entre otros, una molécula del MHC de clase I cargada con un péptido, un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo superagonista anti-CD28 y un anticuerpo superagonista anti-CD2.
- 50 Como se utiliza en el presente documento, una célula "sustancialmente purificada" es una célula que está esencialmente libre de otros tipos de células. Una célula sustancialmente purificada también se refiere a una célula que se ha separado de otros tipos de células con las que normalmente se asocia en su estado de origen natural. En algunos casos, una población de células sustancialmente purificadas se refiere a una población homogénea de células. En otros casos, esta expresión se refiere simplemente a una célula que se ha separado de las células con las que está naturalmente asociadas en su estado natural. En algunas realizaciones, las células se cultivan *in vitro*.
- 55 En otras realizaciones, las células no se cultivan *in vitro*.
- 60 El término "terapéutico", como se usa en el presente documento, significa un tratamiento y/o profilaxis. Se obtiene un efecto terapéutico mediante supresión, remisión o erradicación de un estado de enfermedad.
- 65 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del compuesto objeto que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema o sujeto que está buscando el investigador, veterinario, doctor en

medicina u otro especialista clínico. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" incluye que la cantidad de un compuesto que, cuando se administra, es suficiente para evitar el desarrollo o aliviar en cierta medida, uno o más de los signos o síntomas del trastorno o enfermedad que se está tratando. La cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del compuesto, de la enfermedad y de su gravedad y de la edad, peso, etc., del sujeto que se va a tratar.

"Tratar" una enfermedad, como se usa el término en el presente documento, significa reducir la frecuencia o gravedad de al menos un signo o síntoma de una enfermedad o trastorno experimentado por un sujeto.

10 El término "transfectado" o "transformado" o "transducido", como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso mediante el cual el ácido nucleico exógeno se transfiere o introduce en la célula hospedadora. Una célula "transfectada" o "transformada" o "transducida" es aquella que se ha transfectado, transformado o transducido con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula objeto principal y su progenie.

15 La expresión "bajo control transcripcional" o "unido operativamente", como se usa en el presente documento, significa que el promotor está en la situación y orientación correctas en relación con un polinucleótido para controlar el inicio de la transcripción por la ARN polimerasa y la expresión del polinucleótido.

20 Un "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que se puede usar para administrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. En la técnica se conocen numerosos vectores, que incluyen, aunque no de forma limitativa, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfífilos, plásmidos y virus. Por tanto, el término "vector" incluye un plásmido o un virus que se replica de forma autónoma. El término también debe interpretarse para incluir compuestos no plasmídicos y no víricos que faciliten la transferencia de ácido nucleico a las células, tal como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas y similares.
25 Los ejemplos de vectores víricos incluyen, pero sin limitación, vectores adenovíricos, vectores adenoasociados, vectores víricos y similares.

Intervalos: a lo largo de la presente divulgación, se pueden presentar diversos aspectos de la invención en un formato de intervalo. Debería entenderse que la descripción en formato de intervalo es únicamente por conveniencia y brevedad y no debería interpretarse como una limitación inflexible en el alcance de la invención. Por consiguiente, debería considerarse que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los posibles subintervalos así como valores numéricos individuales en ese intervalo. Por ejemplo, debería considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 tiene subintervalos divulgados específicamente tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto es aplicable independientemente de la amplitud del intervalo.

Descripción

40 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención proporciona composiciones y composiciones para usar en un método para tratar el cáncer, así como otras enfermedades. El cáncer puede ser una neoplasia hematológica, un tumor sólido, un tumor primario o metastásico. Otras enfermedades tratables usando las composiciones de la invención incluyen virus, infecciones bacterianas y parasitarias, así como enfermedades autoinmunitarias.

45 En una realización, la invención proporciona una linfocito T genéticamente diseñada para expresar un CAR, en donde la célula CAR T presenta una propiedad antitumoral. El CAR de la invención se genomanipula para comprender un dominio extracelular que tiene un dominio de unión a antígeno fusionado a un dominio de señalización intracelular de la cadena zeta del complejo receptor de antígeno de linfocitos T (por ejemplo, CD3-zeta), como se define en las reivindicaciones. El CAR de la invención cuando se expresa en un linfocito T es capaz de redirigir el reconocimiento de antígeno basado en la especificidad de unión al antígeno. Un ejemplo de antígeno es CD19, porque este antígeno se expresa en linfocitos B malignos. Sin embargo, la invención no se limita al direccionamiento a CD19. Más bien, la invención incluye cualquier dominio de unión a antígeno que cuando se une a su antígeno afín, afecta a una célula tumoral de modo que la célula tumoral deja de crecer, se le induce a morir o se ve afectada de otro modo para que la carga tumoral en un paciente disminuya o se elimine. El dominio de unión a antígeno se fusiona con los siguientes dominios intracelulares: un dominio de señalización de CD2, un dominio de señalización de CD28, un dominio señal de CD3zeta, como se define en las reivindicaciones.

60 El CAR de la invención comprende un dominio de señalización de CD2. Esto se debe a que la presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que las respuestas de linfocitos T mediadas por CAR de los linfocitos T se pueden mejorar aún más con la adición de dominios coestimuladores. Por ejemplo, la inclusión del dominio de señalización de CD2 influyó significativamente en la producción de citocinas en direcciones tanto positivas como negativas, dependiente de la presencia e identidad de otros dominios coestimuladores en el CAR expresado. En una realización, la invención comprende un CAR que comprende los dominios tanto CD2 como CD28, como se define en las reivindicaciones. En una realización, un linfocito T modificado que expresa CAR con los dominios CD2 y CD28 libera significativamente menos IL-2 en comparación con los linfocitos T que expresan CAR con CD28 pero no CD2.
65 En una realización, un linfocito T modificado que libera menos IL-2 reduce la proliferación de células Treg

inmunosupresoras. Además, la inclusión del dominio de señalización de CD2 redujo significativamente la entrada de calcio. En una realización, la reducción de la entrada de calcio mediante la inclusión de CD2 reduce la muerte de linfocitos T con CAR inducida por la activación.

- 5 En algunas realizaciones, la presente invención está dirigida a un vector retroviral o lentiviral que codifica un CAR que está integrado de manera estable en un linfocito T y que se expresa de manera estable en el mismo. En otras realizaciones, la presente invención está dirigida a un ARN que codifica el CAR que se transfecta en un linfocito T y que se expresa transitoriamente en el mismo. La expresión transitoria, no integrante de CAR en una célula mitiga las preocupaciones asociadas con la expresión permanente e integrada de CAR en una célula.

10

Composiciones

- 15 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio extracelular e intracelular, como se define en las reivindicaciones. El dominio extracelular comprende un elemento de unión específico de diana, también denominado dominio de unión a antígeno. El dominio intracelular o de lo contrario, el dominio citoplasmático comprende, una región de señalización coestimuladora y una porción de cadena zeta. La región de señalización coestimuladora se refiere a una parte del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de la superficie celular distintas de los receptores de antígenos o de sus ligandos que se requieren para una respuesta eficaz de los linfocitos al antígeno.

20

- Entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana del CAR o entre el dominio citoplasmático y el dominio transmembrana del CAR, puede incorporarse un dominio espaciador. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "dominio espaciador" generalmente significa cualquier oligo o polipéptido que sirve para unir el dominio transmembrana al dominio extracelular o al dominio citoplasmático en la cadena polipeptídica. Un dominio espaciador puede comprender hasta 300 aminoácidos, preferentemente de 10 a 100 aminoácidos y lo más preferentemente de 25 a 50 aminoácidos.

25

- 30 La presente invención incluye construcciones de vectores retrovirales y lentivirales que expresan un CAR que se puede transducir directamente a una célula. La presente invención también incluye una construcción de ARN que se puede transfectar directamente en una célula. Un método para generar ARNm para usar en la transfección implica la transcripción *in vitro* (IVT) de un molde con cebadores especialmente diseñados, seguida de la adición de poliA, para producir una construcción que contiene la secuencia no traducida (Untranslated, "UTR") en 3' y 5', una caperuza en 5' y/o sitio interno de entrada al ribosoma (Internal Ribosome Entry Site, IRES), el gen que se va a expresar y una cola de poliA, normalmente de 50 a 2000 bases de longitud. El ARN así producido puede transfectar eficazmente diferentes tipos de células. En una realización, el molde incluye secuencias para el CAR.

35

- El CAR comprende un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático, como se define en las reivindicaciones. El dominio extracelular y el dominio transmembrana pueden proceder de cualquier fuente deseada de dichos dominios.

40

Dominio de unión a antígeno

- 45 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. El dominio extracelular puede obtenerse de cualquiera de la amplia variedad de dominios extracelulares o proteínas secretadas asociadas con la unión de ligandos y/o la transducción de señales. En una realización, el dominio extracelular puede consistir en una cadena pesada de Ig que, a su vez, puede asociarse covalentemente con la cadena ligera de Ig en virtud de la presencia de CHI y de regiones bisagra o puede asociarse covalentemente con otros complejos de cadena ligera/pesada de Ig en virtud de la presencia de dominios de bisagra, CH2 y CH3. En el último caso, el complejo de cadena pesada/ligera que se une a la construcción quimérica puede constituir un anticuerpo con una especificidad distinta de la especificidad del anticuerpo de la construcción quimérica. Dependiendo de la función del anticuerpo, de la estructura deseada y de la transducción de la señal, se puede usar la cadena completa o se puede usar una cadena truncada, donde todo o una parte de los dominios CHI, CH2 o CH3 pueden eliminarse o puede eliminarse toda o parte de la región bisagra.

50

- 55 El dominio extracelular puede dirigirse a cualquier antígeno deseado. Por ejemplo, cuando se desea un CAR antitumoral, el dominio extracelular elegido para incorporarse en el CAR puede ser un antígeno que se asocia con el tumor. El tumor puede ser cualquier tipo de tumor siempre que tenga un antígeno de superficie celular que sea reconocido por el CAR. En otra realización, el CAR puede ser uno para el cual existe actualmente un anticuerpo monoclonal específico o puede generarse en el futuro.

60

- En una realización, el CAR de la invención comprende un elemento de unión específico de diana, también denominado dominio de unión a antígeno. La elección del resto depende del tipo y del número de ligandos que definen la superficie de una célula diana. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno puede elegirse para reconocer un ligando que actúa como un marcador celular en células diana asociadas con un cuadro clínico determinado. Por tanto, los ejemplos de marcadores de superficie celular que pueden actuar como ligandos para el dominio del resto de antígeno en el CAR de la invención incluyen los asociados con infecciones víricas, bacterianas y parasitarias,

65

enfermedad autoinmunitaria y células cancerosas.

En una realización, el vector retroviral o lentiviral comprende un CAR diseñado para dirigirse a un antígeno de interés mediante ingeniería genética de un antígeno deseado en el CAR. En el ámbito de la presente invención, "antígeno tumoral" o "antígeno de trastorno hiperproliferativo" o "antígeno asociado con un trastorno hiperproliferativo", se refieren a antígenos que son comunes a trastornos hiperproliferativos específicos. En determinados aspectos, los antígenos del trastorno hiperproliferativo de la presente invención se derivan de cánceres que incluyen, aunque no de forma limitativa, melanoma primario o metastásico, mesotelioma, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, linfoma no Hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, leucemias, cáncer de útero, cáncer cervicouterino, cáncer de vejiga, cáncer de riñón y adenocarcinomas, tales como el cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y similares.

En otra realización, el molde para el ARN del CAR está diseñado para dirigirse a un antígeno de interés mediante la ingeniería genética de un dominio de unión a antígeno deseado en el CAR. En el ámbito de la presente invención, "antígeno tumoral" o "antígeno de trastorno hiperproliferativo" o "antígeno asociado con un trastorno hiperproliferativo", se refieren a antígenos que son comunes a trastornos hiperproliferativos específicos. En determinados aspectos, los antígenos del trastorno hiperproliferativo de la presente invención se derivan de cánceres que incluyen, aunque no de forma limitativa, melanoma primario o metastásico, mesotelioma, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, linfoma no Hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, leucemias, cáncer de útero, cáncer cervicouterino, cáncer de vejiga, cáncer de riñón y adenocarcinomas, tales como el cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y similares.

Los antígenos tumorales son proteínas producidas por células tumorales que provocan una respuesta inmunitaria, particularmente, respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T. En una realización, el antígeno tumoral de la presente invención comprende uno o más epítopos cancerosos antigénicos reconocidos inmunológicamente por linfocitos infiltrantes de tumores (Tumor Infiltrating Lymphocytes, TIL) derivados de un tumor canceroso de un mamífero. La selección del dominio de unión a antígeno de la invención dependerá del tipo particular de cáncer a tratar. Los antígenos tumorales son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, un antígeno asociado a glioma, antígeno carcinoembrionario (CEA), gonadotropina coriónica humana β , alfafetoproteína (AFP), AFP sensible a lectina, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CAIX, transcriptasa inversa telomerasa humana, RU1, RU2 (AS), carboxilo esterasa intestinal, muthsp70-2, M-CSF, prostasa, antígeno prostático específico (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, prostateína, PSMA, Her2/neu, survivina y telomerasa, antígeno tumoral de carcinoma de próstata-1 (PCTA-1), MAGE, ELF2M, elastasa de neutrófilos, ephrinB2, CD22, factor de crecimiento de insulina (IGF)-I, IGF-II, receptor de IGF-I y mesotelina.

En una realización, el antígeno tumoral comprende uno o más epítopos antigénicos del cáncer asociados con un tumor maligno. Los tumores malignos expresan una cantidad de proteínas que pueden servir como antígenos diana para un ataque inmunitario. Estas moléculas incluyen, pero no se limitan a antígenos específicos de tejido tales como MART-1, tirosinasa y GP 100 en melanoma y fosfatasa ácida prostática (PAP) y antígeno prostático específico (PSA) en cáncer de próstata. Otras moléculas diana pertenecen al grupo de moléculas relacionadas con la transformación, tales como el oncogén HER-2/Neu/ErbB-2. Otro grupo de antígenos diana son los antígenos oncofetales, tales como el antígeno carcinoembrionario (CEA). En el linfoma de linfocitos B, la inmunoglobulina idiotipo específica de tumor, constituye un antígeno de inmunoglobulina verdaderamente específico de tumor que es único para el tumor individual. Los antígenos de diferenciación de linfocitos B tales como CD19, CD20 y CD37 son otros candidatos para antígenos diana en el linfoma de linfocitos B. Algunos de estos antígenos (CEA, HER-2, CD19, CD20, idiotipo) se han utilizado como dianas para la inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales con éxito limitado.

El tipo de antígeno tumoral al que se hace referencia en la invención también puede ser un antígeno específico de tumor (TSA) o un antígeno asociado a tumor (Tumor-Associated Antigen, TAA). Un TSA es exclusivo de células tumorales y no ocurre en otras células del cuerpo. Un antígeno asociado a TAA no es exclusivo de una célula tumoral y, en cambio, también se expresa en una célula normal en condiciones que no inducen un estado de tolerancia inmunológica al antígeno. La expresión del antígeno en el tumor puede ocurrir en condiciones que permiten que el sistema inmunitario responda al antígeno. Los TAA pueden ser antígenos que se expresan en células normales durante el desarrollo fetal cuando el sistema inmunitario es inmaduro e incapaz de responder o pueden ser antígenos que normalmente están presentes en niveles extremadamente bajos en células normales pero que se expresan en niveles mucho más altos en células tumorales.

Los ejemplos no limitantes de antígenos TSA o TAA incluyen los siguientes: antígenos de diferenciación, tales como MART-1/MelanA (MART-1), gp100 (Pmel 17), tirosinasa, TRP-1, TRP-2 y antígenos multilinjaje específicos de tumor, tales como MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p 15; antígenos embrionarios sobreexpresados, tales como CEA; oncogenes sobreexpresados y genes supresores de tumores mutados tales como p53, Ras, HER-2/neu; antígenos tumorales únicos resultantes de translocaciones cromosómicas; tales como BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; y antígenos víricos, tales como los antígenos del virus de Epstein Barr EBVA y los antígenos del virus del papiloma humano (VPH) E6 y E7. Otros antígenos grandes basados en proteínas incluyen TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA

72-4, CAM 17,1, NuMa, K-ras, beta-Catenina, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, alfa-fetoproteína, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27.29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68YP1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV 18, NB/70K, NY-C0-1, RCAS1, SDCCAG16, proteína de unión a TA-90\Mac-2\proteína asociada a la ciclofilina C, TAAL6, TAG72, TLP y TPS.

5 En una realización preferida, la porción del dominio de unión a antígeno de los CAR se dirige a un antígeno que incluye, pero no se limita a, CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, glucolípidos F77, EGFRvIII, GD-2, TCR de MY-ESO-1, TCR de MAGE A3 y similares.

10 Dependiendo del antígeno deseado que sea dirigido, el CAR de la invención se puede genomanipular para incluir el resto de unión a antígeno adecuado que sea específico para la diana de antígeno deseada. Por ejemplo, si el antígeno deseado al que se va a dirigir es CD19, se puede usar un anticuerpo para CD19 como el resto de unión a antígeno para su incorporación al CAR de la invención.

15 Dominio transmembrana

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Con respecto al dominio transmembrana, el CAR puede diseñarse para comprender un dominio transmembrana que se fusiona con el dominio extracelular del CAR. En una realización, se utiliza el dominio transmembrana que se asocia de forma natural a uno de los dominios en el CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana se puede seleccionar o modificar mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de tales dominios a los dominios transmembrana de las mismas o de diferentes proteínas de superficie de la membrana con el fin de minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

25 El dominio transmembrana puede derivar de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivarse de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana. Las regiones transmembrana de uso particular en esta invención pueden derivarse (es decir, comprender al menos la(s) región(es) transmembrana(s)) de la cadena alfa, beta o zeta del receptor de linfocitos T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Como alternativa, el dominio transmembrana puede ser sintético, en cuyo caso comprenderá restos predominantemente hidrófobos tales como leucina y valina. Preferentemente un triplete de fenilalanina, triptófano y valina se encontrará en cada extremo de un dominio transmembrana sintético. Opcionalmente, un enlazador oligo o polipeptídico corto, preferentemente entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización citoplasmática del CAR. Un doblete de glicina-serina es un enlazador particularmente adecuado.

35 Dominio citoplasmático

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. El dominio citoplasmático o de lo contrario, el dominio de señalización intracelular del CAR de la invención es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la que se ha colocado el CAR. La expresión "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de un linfocito T, por ejemplo, puede ser actividad citolítica o actividad auxiliar, incluida la secreción de citocinas. Por lo tanto, la expresión "dominio de señalización intracelular" se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y dirige a la célula a realizar una función especializada. Si bien generalmente puede utilizarse todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario utilizar toda la cadena. En la medida en que se utiliza una porción truncada del dominio de señalización intracelular, tal porción truncada se puede usar en lugar del dominio intacto siempre que transduzca la señal de la función efectora. La expresión "dominio de señalización intracelular" pretende por tanto incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de función efectora.

50 Los ejemplos preferidos de dominios de señalización intracelular para su uso en el CAR de la invención incluyen las secuencias citoplasmáticas del receptor de linfocitos T (T Cell Receptor, TCR) y los co-receptores que actúan en concierto para iniciar la transducción de señales después de la activación del receptor de antígeno, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional.

55 Es bien conocido que las señales generadas a través del TCR solo son insuficientes para la activación total del linfocito T y que también se requiere una señal secundaria o coestimuladora. Por tanto, se puede decir que la activación de linfocitos T está mediada por dos clases distintas de secuencias de señalización citoplasmática: las que inician la activación primaria dependiente de antígeno a través del TCR (secuencias de señalización citoplasmática primaria) y las que actúan de manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmática secundaria).

65 Las secuencias de señalización citoplasmáticas primarias regulan la activación primaria del complejo TCR, de forma estimulante o de forma inhibitoria. Las secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que actúan de forma estimulante pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptores o ITAM.

Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas primarias incluyen las derivadas de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. La molécula de señalización citoplasmática en el CAR de la invención comprende una secuencia de señalización citoplasmática derivada de CD3 zeta.

El dominio citoplasmático del CAR comprende el dominio de señalización de CD3-zeta combinado con una región de señalización coestimuladora, en donde la región de señalización coestimuladora comprende un dominio de señalización de CD2 y además comprende la región de dominio intracelular de un módulo coestimulador de CD28. Una molécula coestimuladora es una molécula de superficie celular que no sea un receptor de antígeno o sus ligandos que se requiere para una respuesta de linfocitos eficaz hacia un antígeno. Entre los ejemplos de tales moléculas se incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (FFA-1), CD2, CD7, FIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83 y similares. La región de señalización coestimuladora es como se define en las reivindicaciones.

Las secuencias de señalización citoplasmática dentro de la porción de señalización citoplasmática del CAR de la invención pueden estar unidas entre sí en un orden aleatorio o especificado. Opcionalmente, un enlazador oligo o polipeptídico corto, preferentemente entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace. Un doblete de glicina-serina es un enlazador particularmente adecuado.

De acuerdo con la invención, el dominio citoplasmático está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28 y CD2. En otra divulgación, el dominio citoplasmático está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28, CD2 y 4-1BB.

Vectores

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención abarca una construcción de ADN que comprende la secuencia de un CAR, en donde la secuencia comprende la secuencia de ácido nucleico de un dominio de unión a antígeno unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico de un dominio intracelular, como se define en las reivindicaciones. El dominio intracelular ilustrativo que se usa en el CAR de la invención incluye el dominio intracelular de CD3-zeta, CD28 y CD2. En algunas divulgaciones, el CAR puede comprender cualquier combinación de CD3-zeta, CD28, 4-1BB, CD2 y similares.

En una realización, el CAR de la invención comprende scFv anti-CD19, dominio humano transmembrana y bisagra CD8 y dominios de señalización de CD2 y CD3zeta humanos, como se define en las reivindicaciones. En una divulgación, el CAR comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 1. En otra divulgación, el CAR comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas deseadas pueden obtenerse utilizando métodos recombinantes conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, seleccionando bibliotecas de células que expresan el gen, derivando el gen de un vector que se sabe que lo incluye o aislándolo directamente de células y de tejidos que lo contienen, utilizando técnicas estándar. Como alternativa, el gen de interés se puede producir de manera sintética, en lugar de clonado.

La presente invención también proporciona vectores en los que se inserta un ADN de la presente invención. Los vectores que provienen de retrovirus tales como el lentivirus son herramientas adecuadas para lograr la transferencia génica a largo plazo, dado que permiten la integración estable a largo plazo de un transgén y su propagación en células hijas. Los vectores lentivíricos tienen la ventaja añadida sobre los vectores derivados de onco-retrovirus, tales como los virus de la leucemia murina, de que pueden transducir células no proliferativas, tales como los hepatocitos. También tienen la ventaja añadida de baja inmunogenicidad.

Como sumario breve, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican CAR se logra normalmente uniendo operativamente un ácido nucleico que codifica el polipéptido CAR o partes del mismo a un promotor e incorporando la construcción en un vector de expresión. Los vectores pueden ser adecuados para eucariotas de replicación e integración. Los vectores de clonación típicos contienen terminadores de transcripción y de traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión de la secuencia de ácido nucleico deseada.

Las construcciones de expresión de la presente invención también se pueden usar para la inmunización de ácido nucleico y la terapia génica, utilizando protocolos estándar de administración de genes. Los métodos para la administración de genes son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.399.346, 5.580.859, 5.589.466. En otra divulgación, la invención proporciona un vector de terapia génica.

El ácido nucleico se puede clonar en varios tipos de vectores. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede clonar en un vector que incluye, pero sin limitación, un plásmido, un fagémido, un derivado de fago, un virus animal y un cósmido.

Los vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas y vectores de secuenciación.

5 Además, el vector de expresión se puede proporcionar a una célula en forma de un vector vírico. La tecnología de vectores víricos es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York) y en otros manuales de virología y biología molecular. Los virus, que son útiles como vectores incluyen, pero sin limitación, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes y lentivirus. En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, una secuencia promotora, sitios de endonucleasas de restricción convenientes y uno o más marcadores seleccionables, (por ejemplo, documento WO 01/96584; documento WO 01/29058; y patente de EE. UU. n.º 6.326.193).

15 Se han desarrollado varios sistemas basados en virus para la transferencia de genes a células de mamíferos. Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente para los sistemas de administración de genes. Un gen seleccionado puede insertarse en un vector y empaquetarse en partículas retrovirales utilizando técnicas conocidas en la técnica. El virus recombinante se puede aislar y administrar a las células del sujeto *in vivo* o *ex vivo*. Se conocen varios sistemas retrovíricos en la técnica. En algunas realizaciones, se usan vectores de adenovirus. Se conocen varios vectores de adenovirus en la técnica. En una realización, se utilizan vectores de lentivirus.

20 Los elementos promotores adicionales, por ejemplo, potenciadores, regulan la frecuencia de iniciación transcripcional. Normalmente, estos están situados en la región 30-110 pb cadena arriba del sitio de inicio, aunque recientemente se ha demostrado que varios promotores también contienen elementos funcionales cadena abajo del sitio de inicio. El espaciado entre los elementos promotores con frecuencia es flexible, de modo que la función promotora se conserva cuando los elementos se invierten o se mueven entre sí. En el promotor de la timidina quinasa (tk), el espacio entre los elementos promotores se puede aumentar a 50 pb antes de que la actividad comience a disminuir. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden actuar de manera cooperativa o independiente para activar la transcripción.

30 Un ejemplo de un promotor adecuado es la secuencia del promotor de citomegalovirus (CMV) temprano inmediato. Esta secuencia promotora es una secuencia promotora constitutiva fuerte capaz de impulsar altos niveles de expresión de cualquier secuencia polinucleotídica operativamente unida a la misma. Otro ejemplo de un promotor adecuado es el factor de crecimiento de elongación -1 α (EF-1 α). Sin embargo, también se pueden usar otras secuencias promotoras constitutivas, incluyendo, aunque no de forma limitativa, el promotor temprano del virus de simio 40 (SV40), virus de tumor mamario de ratón (Mouse Mammary Tumor Virus, MMTV), promotor de la repetición terminal larga (Long Terminal Repeats, LTR) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), promotor de MoMuLV, un promotor del virus de la leucemia aviar, un promotor temprano inmediato del virus de Epstein-Barr, un promotor del virus del sarcoma de Rous, así como promotores de genes humanos, tales como, aunque no de forma limitativa, el promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor de hemoglobina y el promotor de creatina quinasa. Además, la invención no debe limitarse al uso de promotores constitutivos. Los promotores inducibles también se contemplan como parte de la invención. El uso de un promotor inducible proporciona un interruptor molecular capaz de activar la expresión de la secuencia polinucleotídica a la que está unida operativamente cuando se desea tal expresión o desactivar la expresión cuando no se desea expresión. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero sin limitación, un promotor de metalotionina, un promotor de glucocorticoides, un promotor de progesterona y un promotor de tetraciclina.

45 Para evaluar la expresión de un polipéptido CAR o de porciones del mismo, el vector de expresión que se va a introducir en una célula también puede contener un gen marcador seleccionable o un gen indicador o ambos, para facilitar la identificación y selección de células de expresión de la población de células que se busca transfectar o infectar a través de vectores víricos. En otros aspectos, el marcador seleccionable puede llevarse en una pieza separada de ADN y usarse en un procedimiento de cotransfección. Tanto los marcadores seleccionables como los genes indicadores pueden estar flanqueados por secuencias reguladoras adecuadas para permitir la expresión en las células hospedadoras. Los marcadores seleccionables útiles incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos, tales como neo y similares.

55 Los genes indicadores se utilizan para identificar células potencialmente transfectadas y para evaluar la funcionalidad de las secuencias reguladoras. En general, un gen indicador es un gen que no está presente ni se expresa por el organismo o tejido receptor y que codifica un polipéptido cuya expresión se manifiesta por alguna propiedad fácilmente detectable, por ejemplo, actividad enzimática. La expresión del gen indicador se analiza en un momento adecuado después de que el ADN se haya introducido en las células receptoras. Los genes indicadores adecuados pueden incluir genes que codifican la luciferasa, beta-galactosidasa, cloranfenicol acetil transferasa, fosfatasa alcalina secretada o el gen de la proteína verde fluorescente (por ejemplo, Ui-Tei *et al.*, 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Los sistemas de expresión adecuados son bien conocidos y se pueden preparar usando técnicas conocidas o se pueden obtener comercialmente. En general, la construcción con la región flanqueante 5' mínima que muestra el mayor nivel de expresión del gen indicador se identifica como el promotor. Tales regiones promotoras pueden estar unidas a un gen indicador y usarse para evaluar la capacidad de los agentes para modular la transcripción impulsada por el promotor.

Los métodos para introducir y expresar genes en una célula son conocidos en la técnica. En el contexto de un vector de expresión, el vector se puede introducir fácilmente en una célula hospedadora, por ejemplo, de mamífero, bacteriana, levadura o célula de insecto por cualquier método en la técnica. Por ejemplo, el vector de expresión se puede transferir a una célula huésped mediante medios físicos, químicos o biológicos.

Los métodos físicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedadora incluyen precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación y similares. Los métodos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York). Un método preferido para la introducción de un polinucleótido en una célula hospedadora es la transfección con fosfato de calcio.

Los métodos biológicos para introducir un polinucleótido de interés en una célula hospedadora incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores víricos y especialmente los vectores retrovíricos, se han convertido en el método más utilizado para insertar genes en células de mamíferos, por ejemplo, células humanas. Otros vectores víricos pueden provenir de lentivirus, poxvirus, virus del herpes simple I, adenovirus y virus adenoasociados, y similares. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.350.674 y 5.585.362.

Los medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedadora incluyen sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, microesferas y sistemas basados en lípidos, incluidas emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal ilustrativo para usar como vehículo de suministro *in vitro* e *in vivo* es un liposoma (por ejemplo, una vesícula de membrana artificial).

En el caso de que se utilice un sistema de entrega no vírico, un vehículo de administración ilustrativo es un liposoma. Se contempla el uso de formulaciones lipídicas para la introducción de los ácidos nucleicos en una célula hospedadora (*in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*). En otro aspecto, el ácido nucleico puede estar asociado con un lípido. El ácido nucleico asociado a un lípido puede encapsularse en el interior acuoso de un liposoma, intercalarse dentro de la bicapa lipídica de un liposoma, unirse a un liposoma a través de una molécula de enlace que está asociada tanto con el liposoma como con el oligonucleótido, estar atrapado en un liposoma, formar complejo con un liposoma, dispersarse en una solución que contiene un lípido, mezclarse con un lípido, combinarse con un lípido, estar contenido como una suspensión en un lípido, estar contenido o formando un complejo con una micela o asociarse de otra manera a un lípido. Las composiciones asociadas a lípido, lípido/ADN o lípido/vector de expresión no se limitan a ninguna estructura particular en solución. Por ejemplo, pueden estar presentes en una estructura de bicapa, tal como micelas, o con una estructura "colapsada". También pueden estar simplemente intercalados en una solución, posiblemente formando agregados que no son uniformes en tamaño o forma. Los lípidos son sustancias grasas que pueden ser lípidos naturales o sintéticos. Por ejemplo, los lípidos incluyen las gotas de grasa que se dan de manera natural en el citoplasma, así como la clase de compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados, tal como ácidos grasos, alcoholes, aminas, aminoalcoholes y aldehídos.

Los lípidos adecuados para usar se pueden obtener de fuentes comerciales. Por ejemplo, se puede obtener dimiristil fosfatidilcolina ("DMPC") de Sigma, St. Louis, Misuri; se puede obtener fosfato de dicetilo ("DCP") de K & K Laboratories (Plainview, Nueva York); se puede obtener colesterol ("Choi") de Calbiochem-Behring; se pueden obtener dimiristilfosfatidilglicerol ("DMPG") y otros lípidos de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Alabama). Las soluciones madre de lípidos en cloroformo o cloroformo/metanol se pueden almacenar a unos -20 °C. El cloroformo se usa como único solvente ya que se evapora más fácilmente que el metanol. "Liposoma" es un término genérico que abarca una variedad de vehículos lipídicos simples y multilamelares formados por la generación de bicapas o agregados lipídicos cerrados. Los liposomas se pueden caracterizar por tener estructuras vesiculares con una membrana de bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas lipídicas separadas por medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos se reorganizan antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh *et al.*, 1991 Glycobiology 5: 505-10). Sin embargo, también se incluyen composiciones que tienen diferentes estructuras en solución que la estructura vesicular normal. Por ejemplo, los lípidos pueden adoptar una estructura micelar o simplemente existir como agregados no uniformes de moléculas de lípidos. También se contemplan complejos de lipofectamina-ácido nucleico.

Independientemente del método utilizado para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula hospedadora o exponer una célula al inhibidor de la presente invención, para confirmar la presencia de la secuencia de ADN recombinante en la célula hospedadora, pueden realizarse una diversidad de ensayos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos "biológicos moleculares" bien conocidos por los expertos en la materia, tales como los análisis por transferencia de Southern y de Northern, RT-PCR y PCR; ensayos "bioquímicos", tales como detectar la presencia o ausencia de un péptido particular, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA y análisis por transferencia Western) o por ensayos descritos en el presente documento para identificar agentes que están dentro del alcance de la invención.

Transfección de ARN

5 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. En una realización, los linfocitos T genéticamente modificados de la invención se modifican mediante la introducción de ARN. En una realización, el CAR de ARN transcrito *in vitro* se puede introducir en una célula como una forma de transfección transitoria. El ARN se produce por transcripción *in vitro* usando un molde generado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN de interés de cualquier fuente se puede convertir directamente por PCR en un molde para la síntesis de ARNm *in vitro* usando cebadores apropiados y ARN polimerasa. La fuente del ADN puede ser, por ejemplo, ADN genómico, ADN plasmídico, ADN de fago, ADNc, secuencia de ADN sintético o cualquier otra fuente apropiada de ADN. El molde deseado para la transcripción *in vitro* es el CAR de la presente invención. Por ejemplo, el molde para el ARN del CAR comprende un dominio extracelular que comprende un dominio variable de cadena sencilla de un anticuerpo antitumoral; un dominio transmembrana que comprende la bisagra y el dominio transmembrana de CD8a; y un dominio citoplasmático que comprende el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD2.

15 En una realización, el ADN que se utilizará para la PCR contiene un marco de lectura abierto. El ADN puede ser de una secuencia de ADN de origen natural del genoma de un organismo. En una realización, el ADN es un gen de longitud completa de interés de una porción de un gen. El gen puede incluir algunas o todas las regiones no traducidas (UTR) de 5' y/o 3'. El gen puede incluir exones e intrones. En una realización, el ADN que se utilizará para la PCR es un gen humano. En otra realización, el ADN que se utilizará para la PCR es un gen humano que incluye 5' y 3' UTR. El ADN puede ser de manera alternativa una secuencia de ADN artificial que normalmente no se expresa en un organismo natural. Una secuencia de ADN artificial ilustrativa es una que contiene porciones de genes que se ligan juntas para formar un marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión. Las porciones de ADN que están ligadas juntas pueden ser de un solo organismo o de más de un organismo.

25 Los genes que se pueden usar como fuentes de ADN para PCR incluyen genes que codifican polipéptidos que proporcionan un efecto terapéutico o profiláctico a un organismo o que se pueden usar para diagnosticar una enfermedad o trastorno en un organismo. Los genes preferidos son genes que son útiles para un tratamiento a corto plazo o cuando existen problemas de seguridad con respecto a la dosis o al gen expresado. Por ejemplo, para el tratamiento del cáncer, trastornos autoinmunitarios, infecciones parasitarias, víricas, bacterianas, fúngicas u otras, el(los) transgén(es) que se expresará(n) pueden codificar un polipéptido que funciona como un ligando o un receptor para las células del sistema inmunitario o puede funcionar para estimular o inhibir el sistema inmunitario de un organismo. En algunas realizaciones, no es deseable tener una estimulación continua prolongada del sistema inmunitario, ni es necesario producir cambios que duren después de un tratamiento exitoso, ya que esto puede provocar un nuevo problema. Para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario, puede ser deseable inhibir o suprimir el sistema inmunitario durante un brote, pero no a largo plazo, lo que podría provocar que el paciente se vuelva demasiado sensible a una infección.

40 La PCR se utiliza para generar un molde para la transcripción *in vitro* del ARNm que se utiliza para la transfección. Los métodos para realizar la PCR son bien conocidos en la técnica. Los cebadores para su uso en la PCR están diseñados para tener regiones que son sustancialmente complementarias a las regiones del ADN que se utilizará como molde para la PCR. "Sustancialmente complementario", como se utiliza en el presente documento, se refiere a secuencias de nucleótidos donde la mayoría o todas las bases en la secuencia del cebador son complementarias o una o más bases no son complementarias o no coinciden. Las secuencias sustancialmente complementarias pueden hibridar o hibridarse con la diana de ADN prevista en condiciones de hibridación usadas para la PCR. Los cebadores pueden estar diseñados para ser sustancialmente complementarios a cualquier parte del molde de ADN. Por ejemplo, los cebadores se pueden diseñar para amplificar la porción de un gen que normalmente se transcribe en las células (el marco de lectura abierto), incluyendo 5' y 3' UTR. Los cebadores también se pueden diseñar para amplificar una porción de un gen que codifica un dominio particular de interés. En una realización, los cebadores están diseñados para amplificar la región codificante de un ADNc humano, incluyendo todas o partes de las 5' y 3' UTR. Los cebadores útiles para PCR se generan mediante métodos sintéticos que son bien conocidos en la técnica. Los "cebadores directos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a los nucleótidos en el molde de ADN que están cadena arriba de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "Cadena arriba" se utiliza en el presente documento para referirse a una localización 5', respecto a la secuencia de ADN que se va a amplificar en relación con la cadena codificante. Los "cebadores inversos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a un molde de ADN bicatenario que se encuentra cadena abajo de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "Cadena abajo" se usa en el presente documento para referirse a una ubicación 3' respecto a la secuencia de ADN que se va a amplificar en relación con la cadena codificante.

60 Cualquier ADN polimerasa útil para PCR se puede usar en los métodos desvelados en el presente documento. Los reactivos y la polimerasa están disponibles comercialmente de varias fuentes.

65 También se pueden usar estructuras químicas con la capacidad de promover la estabilidad y/o la eficacia de la traducción. El ARN tiene preferentemente 5' y 3' UTR. En una realización, la 5' UTR tiene entre cero y 3000 nucleótidos de longitud. La longitud de las secuencias 5' y 3' UTR que se añadirán a la región codificante se puede

alterar mediante diferentes métodos, incluyendo, aunque no de forma limitativa, diseñar cebadores para PCR que hibridan con diferentes regiones de las UTR. Usando este enfoque, un experto en la materia puede modificar las longitudes de 5' y 3' UTR requeridas para lograr una eficacia de traducción óptima después de la transfección del ARN transcrito.

5 Las 5' y 3' UTR pueden ser las que se dan de forma natural, las 5' y 3' UTR endógenas para el gen de interés. Como alternativa, las secuencias UTR que no son endógenas al gen de interés se pueden añadir incorporando las secuencias UTR en los cebadores directo e inverso o mediante cualquier otra modificación del molde. El uso de secuencias UTR que no son endógenas para el gen de interés puede ser útil para modificar la estabilidad y/o la
10 eficacia de traducción del ARN. Por ejemplo, se sabe que los elementos ricos en AU en secuencias 3' UTR pueden reducir la estabilidad del ARNm. Por tanto, las 3' UTR se pueden seleccionar o diseñar para aumentar la estabilidad del ARN transcrito en función de las propiedades de las UTR que son bien conocidas en la técnica.

15 En una realización, la 5' UTR puede contener la secuencia Kozak del gen endógeno. Como alternativa, cuando la PCR añade una 5' UTR que no es endógena al gen de interés como se describe anteriormente, se puede rediseñar una secuencia de Kozak consensuada añadiendo la secuencia 5' UTR. Las secuencias de Kozak pueden aumentar la eficacia de la traducción de algunas transcripciones de ARN, pero no parece ser necesario para todos los ARN para permitir una traducción eficaz. La necesidad de las secuencias de Kozak para muchos ARNm es conocido en la técnica. En otras realizaciones, la 5' UTR puede provenir de un virus de ARN cuyo genoma de ARN es estable en
20 las células. En otras realizaciones, se pueden usar diversos análogos de nucleótidos en las 3' o 5' UTR para impedir la degradación por exonucleasa del ARNm.

Para permitir la síntesis de ARN a partir de un molde de ADN sin la necesidad de clonar genes, un promotor de transcripción debe estar unido al molde de ADN cadena arriba de la secuencia a transcribir. Cuando se añade una
25 secuencia que funciona como un promotor para una ARN polimerasa al extremo 5' del cebador directo, el promotor de la ARN polimerasa se incorpora al producto de PCR cadena arriba del marco de lectura abierto que se va a transcribir. En una realización preferida, el promotor es un promotor de polimerasa T7, tal como se describe en otra parte del presente documento. Otros promotores útiles incluyen, pero sin limitación, los promotores de ARN polimerasa T3 y SP6. Las secuencias de nucleótidos de consenso para T7, los promotores T3 y SP6 son conocidos
30 en la técnica.

En una realización preferida, el ARNm tiene una caperuza en el extremo 5' y una cola de poli(A) en 3' que determina la unión al ribosoma, el comienzo de la traducción y la estabilidad del ARNm en la célula. En un molde de ADN circular, por ejemplo, ADN plasmídico, la ARN polimerasa produce un producto concatamérico largo que no es
35 adecuado para la expresión en células eucariotas. La transcripción del ADN plasmídico linealizado al final de la 3' UTR da como resultado un ARNm de tamaño normal que no es eficaz en la transfección eucariota, incluso si se poliadenila después de la transcripción.

40 En un molde de ADN lineal, la ARN polimerasa del fago T7 puede prolongar el extremo 3' del transcrito más allá de la última base del molde (Schenborn y Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva y Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003).

El método convencional de integración de tramos de poli(A)/T en un molde de ADN es la clonación molecular. Sin embargo, la secuencia de poliA/T integrada en el ADN plasmídico puede causar inestabilidad plasmídica, es por eso
45 que los moldes de ADN plasmídico obtenidos de células bacterianas a menudo están altamente contaminados con deleciones y otras anomalías. Esto hace que los procedimientos de clonación no solo sean laboriosos y lentos, sino que a menudo no sean fiables. Esta es la causa por la que un método que permita la construcción de moldes de ADN con tramos de poli(A)/T 3' sin clonación sea muy deseable.

50 El segmento de poliA/T del molde de ADN transcripcional se puede producir durante la PCR mediante el uso de un cebador inverso que contiene una cola de poliT, tal como la cola de 100T (el tamaño puede ser 50-5000 T), o después de la PCR por cualquier otro método, incluyendo, aunque no de forma limitativa, unión de ADN o recombinación *in vitro*. Las colas de poli(A) también proporcionan estabilidad a los ARN y reducen su degradación. Generalmente, la longitud de una cola de poli(A) se correlaciona positivamente con la estabilidad del ARN transcrito.
55 En una realización, la cola de poli(A) tiene entre 100 y 5000 adenosinas.

Las colas de poli(A) de los ARN pueden prolongarse aún más después de la transcripción *in vitro* con el uso de una poli(A) polimerasa, tal como poliA polimerasa de *E. coli* (E-PAP). En una realización, aumentar la longitud de una
60 cola de poli(A) de 100 nucleótidos a entre 300 y 400 nucleótidos da como resultado un aumento de aproximadamente el doble en la eficacia de traducción del ARN. Adicionalmente, la unión de diferentes grupos químicos al extremo 3' puede aumentar la estabilidad del ARNm. Tal unión puede contener nucleótidos modificados/artificiales, aptámeros y otros compuestos. Por ejemplo, los análogos de ATP se pueden incorporar en la cola de poli(A) utilizando la poli(A) polimerasa. Los análogos de ATP pueden aumentar aún más la estabilidad del ARN.
65

Las caperuzas de 5' también proporcionan estabilidad a las moléculas de ARN. En una realización preferida, los

ARN producidos por los métodos divulgados en el presente documento incluyen una caperuza en 5'. La caperuza en 5' se proporciona usando técnicas conocidas en la materia y descritas en el presente documento (Cougot, *et al.*, Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, *et al.*, RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, *et al.*, Biochim. Biophys. Res. Commun., 330: 958-966 (2005)).

5 Los ARN producidos mediante los métodos divulgados en el presente documento también pueden contener una secuencia de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés). La secuencia IRES puede ser cualquier secuencia vírica, cromosómica o diseñada artificialmente que inicia la unión del ribosoma independiente de la caperuza al ARNm y facilita el inicio de la traducción. Puede incluirse cualquier soluto adecuado para la electroporación celular, que pueden contener factores que facilitan la permeabilidad y viabilidad celular, tal como azúcares, péptidos, lípidos, proteínas, antioxidantes y tensioactivos.

15 El ARN se puede introducir en las células diana utilizando cualquiera de varios métodos diferentes, por ejemplo, métodos disponibles comercialmente que incluyen, pero sin limitación, electroporación (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Colonia, Alemania)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Massachusetts) o el Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colorado), Multiporator (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), transfección mediada por liposomas catiónicos mediante lipofección, encapsulación de polímeros, transfección mediada por péptidos o sistemas de administración de partículas biolísticas, tales como "pistolas de genes" (véase, por ejemplo, Nishikawa, *et al.* Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001)).

20 Linfocitos T genéticamente modificados

25 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. En algunas realizaciones, las secuencias de CAR se administran a las células usando un vector retrovívico o lentivívico. Los vectores retrovíricos y lentivíricos que expresan CAR se pueden administrar en diferentes tipos de células eucariotas, así como en tejidos y organismos completos utilizando células transducidas como vehículo o suministro local o sistémico sin células de vectores encapsulados, unidos o desnudos. El método utilizado puede ser para cualquier propósito donde se requiera o sea suficiente una expresión estable.

30 En otras realizaciones, las secuencias de CAR se administran en las células usando ARNm transcrito *in vitro*. El ARNm transcrito *in vitro* se puede administrar a diferentes tipos de células eucariotas, así como a tejidos y organismos completos utilizando células transfectadas como vehículo o suministro local o sistémico sin células de ARNm encapsulado, unido o desnudo. El método utilizado puede ser para cualquier propósito donde la expresión transitoria sea necesaria o suficiente.

35 Los métodos desvelados se pueden aplicar a la modulación de la actividad de los linfocitos T en la investigación básica y la terapia, en los campos del cáncer, células madre, infecciones agudas y crónicas y enfermedades autoinmunitarias, incluida la evaluación de la capacidad de los linfocitos T genéticamente modificados para eliminar una célula cancerosa diana.

40 Los métodos también proporcionan la capacidad de controlar el nivel de expresión en un amplio intervalo cambiando, por ejemplo, el promotor o la cantidad de ARN de entrada, haciendo posible regular individualmente el nivel de expresión. Además, la técnica de la producción de ARNm basada en la PCR facilita enormemente el diseño de los ARNm del receptor quimérico con diferentes estructuras y la combinación de sus dominios. Por ejemplo, la variación de diferentes dominios efectores/coestimuladores intracelulares en múltiples receptores quiméricos en la misma célula permite la determinación de la estructura de las combinaciones de receptores que evalúan el nivel más alto de citotoxicidad contra múltiples dianas antigénicas y al mismo tiempo, la citotoxicidad más baja hacia las células normales.

45 Una ventaja de los métodos de transfección de ARN de la invención es que la transfección de ARN es esencialmente transitoria y sin vectores: Un transgén de ARN se puede administrar a un linfocito y se puede expresar en él después de una breve activación celular *in vitro*, como un casete de expresión mínimo sin la necesidad de secuencias víricas adicionales. En estas condiciones, la integración del transgén en el genoma de la célula hospedadora es improbable. La clonación de células no es necesaria debido a la eficacia de la transfección del ARN y a su capacidad para modificar uniformemente toda la población de linfocitos.

50 La modificación genética de linfocitos T con ARN transcrito *in vitro* (IVT-ARN) utiliza dos estrategias diferentes, las cuales han sido probadas sucesivamente en varios modelos animales. Las células se transfectan con ARN transcrito *in vitro* mediante lipofección o electroporación. Preferentemente, es deseable estabilizar el IVT-ARN utilizando diversas modificaciones para lograr una expresión prolongada del IVT-ARN transferido.

55 Se conoce en la bibliografía que algunos vectores IVT se utilizan de manera convencional como molde para la transcripción *in vitro* y que se han modificado genéticamente de tal manera que se producen transcritos de ARN estabilizados. Actualmente, los protocolos utilizados en la técnica se basan en un vector plasmídico con la siguiente estructura: un promotor de ARN polimerasa 5' que permite la transcripción de ARN, seguido de un gen de interés que está flanqueado en 3' y/o 5' por regiones no traducidas (UTR), y un casete de poliadenilo 3' que contiene

nucleótidos 50-70 A. Antes de la transcripción *in vitro*, el plásmido circular se linealiza cadena abajo del casete de poliadenilo mediante enzimas de restricción de tipo II (la secuencia de reconocimiento se corresponde con el sitio de escisión).

- 5 El casete de poliadenilo se corresponde, por lo tanto, con la secuencia posterior de poli(A) en el transcrito. Como resultado de este procedimiento, algunos nucleótidos permanecen como parte del sitio de escisión enzimática después de la linealización y extienden o enmascaran la secuencia de poli(A) en el extremo 3'. No está claro, si esta proyección no fisiológica afecta a la cantidad de proteína producida intracelularmente a partir de tal construcción.
- 10 El ARN tiene varias ventajas sobre las estrategias víricas o plasmídicas más tradicionales. La expresión génica de una fuente de ARN no requiere transcripción y el producto proteico se produce rápidamente después de la transfección. Además, debido a que el ARN solo tiene que acceder al citoplasma, en lugar del núcleo, por lo tanto, los métodos de transfección típicos dan como resultado una tasa de transfección extremadamente alta. Además, las estrategias basadas en plásmidos requieren que el promotor que dirige la expresión del gen de interés esté activo en las células en estudio.

En otro aspecto, la construcción de ARN se puede suministrar a las células por electroporación. Véanse, por ejemplo, las formulaciones y la metodología de electroporación de construcciones de ácido nucleico en células de mamíferos tal como se enseña en los documentos US 2004/0014645, US 2005/0052630A1, US 2005/0070841A1, US 2004/0059285A1, US 2004/0092907A1. Los diversos parámetros que incluyen la intensidad del campo eléctrico requerida para la electroporación de cualquier tipo de célula conocida se conocen generalmente en la bibliografía de investigación relevante, así como en numerosas patentes y aplicaciones en el campo. Véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.678.556, la patente de EE. UU. n.º 7.171.264 y la patente de EE. UU. n.º 7.173.116. Los equipos para la aplicación terapéutica de electroporación están disponibles comercialmente, por ejemplo, el sistema de terapia de electroporación de ADN MedPulser™ (Inovio/Genetronics, San Diego, California) y se describen en patentes tales como la patente de Estados Unidos n.º 6.567.694; la patente de EE. UU. n.º 6.516.223, la patente de EE. UU. n.º 5.993.434, la patente de EE. UU. n.º 6.181.964, la patente de EE. UU. n.º 6.241.701 y la patente de EE. UU. n.º 6.233.482; la electroporación también se puede usar para la transfección de células *in vitro* tal como se describe, por ejemplo, en el documento US20070128708A1. La electroporación también se puede utilizar para suministrar ácidos nucleicos a las células *in vitro*. Por consiguiente, la administración mediada por electroporación en células de ácidos nucleicos, incluidas las construcciones de expresión que utilizan cualquiera de los muchos dispositivos disponibles y sistemas de electroporación conocidos por los expertos en la materia, presenta un nuevo y emocionante medio para suministrar un ARN de interés a una célula diana.

35 Fuentes de linfocitos T

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Antes de la expansión y modificación genética de los linfocitos T de la invención, se obtiene una fuente de linfocitos T de un sujeto. Los linfocitos T se pueden obtener de varias fuentes, que incluyen células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de los ganglios linfáticos, sangre de cordón, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores. En determinadas realizaciones de la presente invención, puede utilizarse cualquier cantidad de líneas de linfocitos T disponibles en la técnica. En determinadas realizaciones de la presente invención, los linfocitos T se pueden obtener a partir de una unidad de sangre extraída de un sujeto usando cualquier cantidad de técnicas conocidas por el experto en la materia, tal como la separación de Ficoll™. En una divulgación, las células de la sangre en circulación de un individuo se obtienen por aféresis. El producto de aféresis normalmente contiene linfocitos, incluyendo linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En una realización, las células recogidas por aféresis se pueden lavar para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un tampón o medio adecuado para las etapas de procesamiento posteriores. En una realización de la invención, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En una realización alternativa, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, sino de todos, los cationes divalentes. De nuevo, sorprendentemente, las etapas iniciales de activación en ausencia de calcio conducen a una activación magnificada. Como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica, una etapa de lavado puede realizarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, tal como mediante el uso de una centrifuga de "flujo continuo" semiautomática (por ejemplo, el procesador celular Cobe 2991, el Baxter CytoMate o el Haemonetics Cell Saver 5) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras el lavado, las células pueden resuspenderse en una variedad de tampones biocompatibles, tales como, por ejemplo, PBS sin Ca²⁺, sin Mg²⁺, PlasmaLyte A u otra solución salina con o sin tampón. Como alternativa, los componentes indeseables de la muestra de aféresis pueden eliminarse y las células pueden resuspenderse directamente en medios de cultivo.

60 En otra divulgación, los linfocitos T se aíslan de los linfocitos de la sangre periférica lisando los glóbulos rojos y agotando los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente de PERCOLL™ o por elutriación centrífuga a contracorriente. Una subpoblación específica de linfocitos T, tales como linfocitos T CD3⁺, CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ y CD45RO⁺, puede aislarse aún más mediante técnicas de selección positiva o negativa. Por ejemplo, se aíslan linfocitos T mediante incubación con perlas conjugadas anti-CD3/anti-CD28 (es decir, 3x28), tales como DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, durante un período de tiempo suficiente para la selección positiva de los linfocitos T deseados. El período de tiempo puede ser de unos 30 minutos. El período de

tiempo puede variar de 30 minutos a 36 horas o más y todos los valores enteros intermedios. El período de tiempo puede ser de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. El período de tiempo puede ser de 10 a 24 horas. El período de tiempo de incubación puede ser de 24 horas. Para el aislamiento de linfocitos T de pacientes con leucemia, el uso de tiempos de incubación más largos, tal como 24 horas, puede aumentar el rendimiento celular. Se pueden usar tiempos de incubación más prolongados para aislar los linfocitos T en cualquier situación en la que haya pocos linfocitos T en comparación con otros tipos de células, tales como el aislamiento de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) a partir de tejido tumoral o de individuos inmunocomprometidos. Además, el uso de tiempos de incubación más largos puede aumentar la eficiencia de captura de linfocitos T CD8⁺. Por tanto, simplemente acortando o alargando el tiempo que se permite que los linfocitos T se unan a las perlas CD3/CD28 y/o aumentando o disminuyendo la relación de perlas respecto a linfocitos T (como se describe más adelante en el presente documento), pueden seleccionarse preferentemente las subpoblaciones de linfocitos T a favor o en contra al inicio del cultivo o en otros puntos temporales durante el proceso. Adicionalmente, aumentando o disminuyendo la relación de anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 en las perlas u otra superficie, pueden seleccionarse preferentemente las subpoblaciones de linfocitos T a favor o en contra al inicio del cultivo o en otros puntos temporales. El experto en la materia reconocería que también se pueden utilizar múltiples rondas de selección en el contexto de esta invención. Puede ser deseable realizar el procedimiento de selección y utilizar las células "no seleccionadas" en el proceso de activación y expansión. Las células "no seleccionadas" también pueden someterse a más rondas de selección.

El enriquecimiento de una población de linfocitos T por selección negativa se puede lograr con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie únicos para las células seleccionadas negativamente. Un método es la clasificación y/o selección celular mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza una mezcla de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4⁺ por selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales normalmente incluye anticuerpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8. En determinadas realizaciones, puede ser deseable enriquecer o seleccionar positivamente los linfocitos T reguladores que normalmente expresan CD4⁺, CD25⁺, CD62L^{hi}, GITR⁺ y FoxP3⁺. Como alternativa, los linfocitos T reguladoras se agotan mediante perlas conjugadas anti-CD25 u otro método de selección similar.

Para el aislamiento de una población deseada de células por selección positiva o negativa, la concentración de células y superficie (por ejemplo, partículas, tales como perlas) puede variar. Puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan las perlas y las células (es decir, aumentar la concentración de células), para garantizar el máximo contacto de células y perlas. Por ejemplo, se puede utilizar una concentración de 2 mil millones de células/ml. Se puede utilizar una concentración de 1 billón de células/ml. En una realización adicional, se pueden utilizar más de 100 millones de células/ml. Puede usarse una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. Puede usarse una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. Pueden utilizarse concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede dar como resultado un mayor rendimiento celular, activación celular y expansión celular. Además, el uso de altas concentraciones de células permite una captura más eficaz de células que pueden expresar débilmente los antígenos diana de interés, tales como linfocitos T CD28 negativos o de muestras donde hay muchas células tumorales presentes (es decir, sangre leucémica, tejido tumoral, etc.). Tales poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable obtenerlas en ciertas realizaciones. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficaz de linfocitos T CD8⁺ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

En una divulgación relacionada, puede ser deseable usar concentraciones más bajas de células. Al diluir considerablemente la mezcla de linfocitos T y de superficie (por ejemplo, partículas tales como perlas), las interacciones entre las partículas y las células se minimizan. Esto selecciona las células que expresan altas cantidades de antígenos deseados para unirse a las partículas. Por ejemplo, los linfocitos T CD4⁺ expresan niveles más altos de CD28 y se capturan más eficazmente que los linfocitos T CD8⁺ en concentraciones diluidas. En una divulgación, la concentración de células usada es 5×10^6 /ml. En otras divulgaciones, la concentración usada puede ser de aproximadamente 1×10^5 /ml a 1×10^6 /ml y cualquier valor entero intermedio.

En otra divulgación, las células se pueden incubar en un rotador durante períodos de tiempo variables a velocidades variables a 2-10 °C o a temperatura ambiente.

Los linfocitos T para la estimulación también se pueden congelar después de una etapa de lavado. Deseando no quedar ligado a teoría alguna, la etapa de congelación y de descongelación posterior proporciona un producto más uniforme al eliminar los granulocitos y en cierta medida, los monocitos en la población celular. Después de la etapa de lavado que elimina el plasma y las plaquetas, las células se pueden suspender en una solución de congelación. Si bien muchas soluciones y parámetros de congelación se conocen en la técnica y serán útiles en este contexto, un método implica el uso de PBS que contiene DMSO al 20 % y albúmina sérica humana al 8 % o medios de cultivo que contienen dextrano 40 al 10 % y dextrosa al 5 %, albúmina de suero humano al 20 % y DMSO al 7,5 % o plasmalyte-A al 31,25 %, dextrosa al 5 %, NaCl al 0,45 %, dextrano 40 al 10 % y dextrosa al 5 %, albúmina de suero humano al 7,5 % y DMSO al 7,5 % u otro medio de congelación celular adecuado que contenga, por ejemplo, Hesperan and Plasmalyte A. A continuación, las células se congelan a -80 °C a una velocidad de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Se pueden utilizar otros

métodos de congelación controlada, así como la congelación no controlada inmediatamente a -20 °C o en nitrógeno líquido.

5 En cierta divulgación, las células criopreservadas se descongelan y lavan como se describe en el presente documento y se dejan reposar durante una hora a temperatura ambiente antes de la activación usando los métodos divulgados en el presente documento.

10 También se describe la recolección de muestras de sangre o de producto de aféresis de un sujeto en un período de tiempo anterior al momento en que podrían necesitarse las células expandidas como se describe en el presente documento. Como tal, la fuente de las células a expandir se puede recopilar en cualquier punto temporal y las células deseadas, tales como linfocitos T, aislarse y congelarse para un uso posterior en la terapia de linfocitos T para cualquier número de enfermedades o afecciones que se beneficiarían de la terapia de linfocitos T, tales como las descritas en el presente documento. En una divulgación, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente sano. En determinadas divulgaciones, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto en general sano que está en riesgo de desarrollar una enfermedad, pero que aún no ha desarrollado una enfermedad y las células de interés se aíslan y se congelan para un uso posterior. En determinadas divulgaciones, los linfocitos T pueden expandirse, congelarse y utilizarse en un momento posterior. En determinadas divulgaciones, las muestras se recogen de un paciente poco después del diagnóstico de una enfermedad particular, como se describe en el presente documento, pero antes de cualquier tratamiento. En una divulgación adicional, las células se aíslan de una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto antes de cualquiera de varias modalidades de tratamiento relevantes, incluyendo, aunque no de forma limitativa, el tratamiento con agentes tales como natalizumab, efalizumab, agentes antiviricos, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoblivos, tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3, citoxano, iludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228 e irradiación. Estos fármacos inhiben la calcineurina fosfatasa dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la p70S6 quinasa que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina) (Liu *et al.*, Cell 66:807-815, 1991; Henderson *et al.*, Immun. 73:316-321, 1991; Bierer *et al.*, Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). En una divulgación adicional, las células se aíslan para un paciente y se congelan para usar después junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o tras) un trasplante de médula ósea o de células madre, La terapia de ablación de linfocitos T usando cualquiera de los agentes de quimioterapia, tales como, fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. En otra divulgación, las células se aíslan antes y se pueden congelar para un uso posterior en el tratamiento después de la terapia de ablación de linfocitos B, tal como los agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan.

35 En una divulgación adicional, los linfocitos T se obtienen de un paciente directamente después del tratamiento. En este sentido, se ha observado que después de ciertos tratamientos contra el cáncer, en particular tratamientos con medicamentos que dañan el sistema inmunitario, poco después del tratamiento durante el período en que los pacientes normalmente se estarían recuperando del tratamiento, la calidad de los linfocitos T obtenidos puede ser óptima o mejorada por su capacidad de expansión *ex vivo*. Del mismo modo, tras la manipulación *ex vivo* usando los métodos descritos en el presente documento, estas células pueden estar en un estado preferido para mejorar el injerto y la expansión *in vivo*. Por tanto, se contempla dentro del contexto de la presente divulgación recolectar células sanguíneas, incluyendo linfocitos T, células dendríticas u otras células del linaje hematopoyético, durante esta fase de recuperación. Además, en determinadas realizaciones, se pueden usar la movilización (por ejemplo, la movilización con GM-CSF) y regímenes de acondicionamiento para crear una condición en un sujeto en donde la repoblación, la recirculación, la regeneración y/o la expansión de determinados tipos de células se favorece, especialmente durante una ventana temporal definida después de la terapia. Los tipos de células ilustrativos incluyen linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas y otras células del sistema inmunitario.

50 Activación y expansión de linfocitos T

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Ya sea antes o después de la modificación genética de los linfocitos T para expresar un CAR deseable, los linfocitos T se pueden activar y expandir generalmente usando los métodos descritos, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 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 en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20060121005.

60 Generalmente, los linfocitos T de la invención se expanden por contacto con una superficie que se une a un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de los linfocitos T. En particular, las poblaciones de linfocitos T pueden estimularse como se describe en el presente documento, tal como por contacto con un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie o por contacto con un activador de proteína quinasa C (por ejemplo, briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la coestimulación de una molécula accesoria en la superficie de los linfocitos T, se utiliza un ligando que se une a la molécula accesoria. Por ejemplo, una población de linfocitos T se puede poner en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en condiciones adecuadas para estimular la proliferación de los linfocitos T. Para estimular la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o de

linfocitos T CD8⁺, un anticuerpo anti-CD3 o un anticuerpo anti-CD28. Entre los ejemplos de un anticuerpo anti-CD28 se incluyen 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diaclone, Besanpon, Francia), que pueden utilizarse así como pueden utilizarse otros métodos conocidos en la técnica (Berg *et al.*, Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen *et al.*, J. Exp. Med. 190(9): 13191328, 1999; Garland *et al.*, J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

5 En determinadas divulgaciones, la señal de estimulación primaria y la señal de coestimulación para el linfocito T pueden proporcionarse mediante diferentes protocolos. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada señal pueden estar en solución o acoplados a una superficie. Cuando se acoplan a una superficie, los agentes se pueden acoplar a la misma superficie (es decir, en formación "cis") o a superficies separadas (es decir, en formación "trans").
 10 Como alternativa, un agente puede estar acoplado a una superficie y el otro agente en solución. En una divulgación, el agente que proporciona la señal coestimuladora está unido a una superficie celular y el agente que proporciona la señal de activación primaria está en solución o acoplado a una superficie. En determinadas divulgaciones, ambos agentes pueden estar en solución. En otra divulgación, los agentes pueden estar en forma soluble y a continuación, reticularse a una superficie, tal como una célula que expresa receptores Fc o un anticuerpo u otro agente de unión
 15 que se unirá a los agentes. En este sentido, véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20040101519 y 20060034810 para células presentadoras de antígenos artificiales (aAPC) que se contemplan para usar en la activación y expansión de linfocitos T en la presente invención.

20 En una divulgación, los dos agentes están inmovilizados en perlas, ya sea en la misma perla, es decir, "cis", o en perlas separadas, es decir, "trans". A modo de ejemplo, el agente que proporciona la señal de activación primaria es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y el agente que proporciona la señal coestimuladora es un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y ambos agentes se inmovilizan conjuntamente en la misma perla en cantidades moleculares equivalentes. En una divulgación, se usa una relación de 1:1 de cada anticuerpo unido a las perlas para la expansión de linfocitos T CD4⁺ y el crecimiento de
 25 linfocitos T. En ciertos aspectos preferidos de la presente divulgación, se usa una relación de anticuerpos anti-CD3:anti-CD28 unidos a las perlas, de manera que se observa un aumento en la expansión de linfocitos T en comparación con la expansión observada usando una relación de 1:1. En una divulgación particular, se observa un aumento de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 veces en comparación con la expansión observada usando una relación de 1:1. En una divulgación, la relación de anticuerpo CD3:CD28 unido a las perlas varía de 100:1 a
 30 1:100 y todos los valores enteros entre ellos. En un aspecto de la presente divulgación, se une más anticuerpo anti-CD28 a las partículas que el anticuerpo anti-CD3, es decir, la relación de CD3:CD28 es menor que uno. En ciertas realizaciones de la divulgación, la relación de anticuerpo anti-CD28 respecto a anticuerpo anti-CD3 unido a las perlas es mayor que 2:1. En una divulgación particular, se utiliza una relación de anticuerpos de CD3:CD28 de 1:100 unidos a las perlas. En otra divulgación, se utiliza una relación de anticuerpos de CD3:CD28 de 1:75 unidos a las perlas. En una divulgación adicional, se utiliza una relación de anticuerpos de CD3:CD28 de 1:50 unidos a las perlas.
 35 En otra divulgación, se utiliza una relación de anticuerpos de CD3:CD28 de 1:30 unidos a las perlas. En una divulgación, se utiliza una relación de anticuerpos de CD3:CD28 de 1:10 unidos a las perlas. En otra divulgación, se utiliza una relación de anticuerpos de CD3:CD28 de 1:3 unidos a las perlas. En otra divulgación más, se utiliza una relación de anticuerpos de CD3:CD28 de 3:1 unidos a las perlas.

40 Las relaciones de partículas respecto a células de 1:500 a 500:1 y cualquier valor entero intermedio pueden usarse para estimular los linfocitos T u otras células diana. Como los expertos en la materia pueden apreciar fácilmente, la relación de partículas respecto a células puede depender del tamaño de las partículas con respecto a la célula diana. Por ejemplo, las perlas de tamaño pequeño solo podían unirse a unas pocas células, si bien las perlas más grandes
 45 podrían unir muchas. En ciertas realizaciones, la relación de células respecto a partículas varía de 1:100 a 100:1 y cualquier valor entero intermedio y en realizaciones adicionales, la relación comprende 1:9 a 9:1 y cualquier valor entero intermedio también se puede utilizar para estimular los linfocitos T. La relación de partículas acopladas anti-CD3 y anti-CD28 frente a los linfocitos T que dan como resultado la estimulación de los linfocitos T puede variar tal como se indicó anteriormente, sin embargo, ciertos valores preferidos incluyen 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10,
 50 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 y 15:1, con una relación preferida de al menos 1:1 de partículas por linfocito T. En una divulgación, se usa una relación de partículas a células de 1:1 o menos. En una divulgación particular, una relación de partícula:células preferida es 1:5. En divulgaciones adicionales, la relación de partículas respecto a células puede variar según el día de la estimulación. Por ejemplo, en una divulgación, la relación de partículas respecto a células es de 1:1 a 10:1 el primer día y se añaden partículas
 55 adicionales a las células todos los días o cada dos días a partir de entonces hasta 10 días, en relaciones finales de 1:1 a 1:10 (basado en recuentos de células el día de la adición). En una divulgación particular, la relación de partículas respecto a células es de 1:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:5 el tercer y quinto día de estimulación. En otra divulgación, las partículas se añaden diariamente o cada dos días hasta una relación final de 1:1 el primer día y 1:5 el tercer y quinto día de estimulación. En otra divulgación, la relación de partículas respecto a
 60 células es de 2:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:10 el tercer y quinto día de estimulación. En otra divulgación, las partículas se añaden diariamente o cada dos días hasta una relación final de 1:1 el primer día y 1:10 el tercer y quinto día de estimulación. Un experto en la materia apreciará que una variedad de otras relaciones puede ser adecuadas para usar en la presente invención. En particular, las relaciones variarán dependiendo del tamaño de partícula y del tamaño y tipo de célula.

65 En divulgaciones adicionales, las células, tales como linfocitos T, se combinan con perlas recubiertas de agente, las

perlas y las células se separan posteriormente y a continuación, se cultivan las células. En una divulgación alternativa, antes del cultivo, las perlas y las células recubiertas con agente no se separan sino que se cultivan juntas. En una divulgación adicional, las perlas y las células se concentran primero mediante la aplicación de una fuerza, tal como una fuerza magnética, lo que da como resultado una mayor ligadura de marcadores de superficie celular, induciendo de este modo la estimulación celular.

A modo de ejemplo, las proteínas de la superficie celular pueden ligarse permitiendo que las perlas paramagnéticas a las que se unen los anti-CD3 y anti-CD28 (3x28 perlas) entren en contacto con los linfocitos T. En una realización, las células (por ejemplo, de 10^4 a 10^9 linfocitos T) y las perlas (por ejemplo, perlas paramagnéticas DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T en una relación de 1:1) se combinan en un tampón, preferentemente PBS (sin cationes divalentes tales como calcio y magnesio). De nuevo, los expertos en la materia pueden apreciar fácilmente que se puede usar cualquier concentración celular. Por ejemplo, la célula diana puede ser muy infrecuente en la muestra y comprender solo un 0,01 % de la muestra o la célula diana de interés puede comprender toda la muestra (es decir, 100 %). Por consiguiente, cualquier número de células está dentro del contexto de la presente divulgación. En determinadas divulgaciones, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan las partículas y las células (es decir, aumentar la concentración de células), para garantizar el máximo contacto de células y partículas. Por ejemplo, en una divulgación, se usa una concentración de aproximadamente 2 mil millones de células/ml. En otra divulgación, se utilizan más de 100 millones de células/ml. En una divulgación adicional, se utiliza una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. En otra divulgación más, se utiliza una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En una divulgación adicional, pueden utilizarse concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede dar como resultado un mayor rendimiento celular, activación celular y expansión celular. Además, el uso de altas concentraciones de células permite una captura más eficaz de células que pueden expresar débilmente los antígenos diana de interés, tales como los linfocitos T CD28 negativos. Dichas poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable obtenerlas en ciertas realizaciones. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficaz de linfocitos T CD8⁺ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

En una divulgación, la mezcla se puede cultivar durante varias horas (aproximadamente 3 horas) a aproximadamente 14 días o cualquier valor entero de horas intermedio. En otra divulgación, la mezcla se puede cultivar durante 21 días. En una divulgación, las perlas y los linfocitos T se cultivan juntos durante aproximadamente ocho días. En otra divulgación, las perlas y los linfocitos T se cultivan juntos durante 2-3 días. También pueden desearse varios ciclos de estimulación de modo que el tiempo de cultivo de los linfocitos T pueda ser de 60 días o más. Las condiciones adecuadas para el cultivo de linfocitos T incluyen unos medios adecuados (por ejemplo, Minimal Essential Media o RPMI Media 1640 o X-vivo 15, (Lonza)) que puede contener factores necesarios para la proliferación y la viabilidad, incluyendo suero (por ejemplo, suero fetal bovino o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β y TNF- α o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocido por el experto en la materia. Otros aditivos para el crecimiento de las células incluyen, pero sin limitación, tensioactivo, plasmanato y agentes reductores, tales como N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, sin suero o complementados con una cantidad adecuada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas y/o una cantidad de una o más citocinas suficiente para el crecimiento y la expansión de los linfocitos T. Los antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomina, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se van a infundir en un sujeto. Las células diana se mantienen en condiciones necesarias para apoyar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura adecuada (por ejemplo, 37 °C) y atmósfera (por ejemplo, aire más CO₂ al 5 %).

Los linfocitos T que han estado expuestos a tiempos de estimulación variados pueden presentar características diferentes. Por ejemplo, la sangre típica o los productos de células mononucleares de sangre periférica de aféresis tienen una población de linfocitos T auxiliares (T_H, CD4⁺) que es mayor que la población de linfocitos T citotóxicos o supresores (T_C, CD8⁺). La expansión de linfocitos T *ex vivo* mediante la estimulación de los receptores CD3 y CD28 produce una población de linfocitos T que antes de los días 8-9 consiste predominantemente en células T_H, si bien después de aproximadamente los días 8-9, la población de linfocitos T comprende una población cada vez mayor de células T_C. Por consiguiente, dependiendo de la finalidad del tratamiento, infundir a un sujeto con una población de linfocitos T que comprende predominantemente linfocitos T_H puede ser ventajoso. De manera similar, si se ha aislado un subconjunto específico de antígeno de linfocitos T_C, puede ser beneficioso expandir este subconjunto en mayor grado.

Además, junto con los marcadores CD4 y CD8, otros marcadores fenotípicos varían significativamente, pero en gran parte, de manera reproducible durante el transcurso del proceso de expansión celular. Por tanto, dicha reproducibilidad permite la capacidad de personalizar un producto de linfocitos T activados para fines específicos.

Aplicación terapéutica

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención abarca un linfocito T modificado para expresar un CAR que combina un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico con un

dominio intracelular de CD3-zeta, CD28 y CD2. Por tanto, en algunos casos, el linfocito T modificado puede provocar una respuesta de linfocitos T mediada por CAR.

5 La invención proporciona el uso de un CAR para redirigir la especificidad de un linfocito T primario a un antígeno tumoral. Por tanto, la invención también proporciona un linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR para usar en un método de terapia de una enfermedad, en donde el método comprende estimular una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T a una población celular o tejido diana en un mamífero, comprendiendo el método administrar a un mamífero una cantidad eficaz del linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora que comprende un dominio de señalización de CD2 y el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28 y un dominio de señalización de CD3 zeta y en donde el dominio de unión a antígeno se selecciona para reconocer específicamente la población celular o tejido diana.

15 En una realización, la presente invención incluye un tipo de terapia celular donde los linfocitos T se modifican genéticamente para expresar un CAR como se define en las reivindicaciones y donde el linfocito T CAR para usar en un método de tratamiento por infusión es para un destinatario que lo necesita. La célula infundida puede eliminar células tumorales en el destinatario. A diferencia de las terapias con anticuerpos, los linfocitos T CAR pueden replicarse *in vivo*, dando como resultado una persistencia a largo plazo que puede llevar a un control tumoral sostenido.

20 En una realización, los linfocitos T CAR de la invención pueden experimentar una expansión robusta de linfocitos T *in vivo* y pueden persistir durante un período prolongado de tiempo. En otra realización, los linfocitos T CAR de la invención evolucionan a linfocitos T de memoria específica que se pueden reactivar para inhibir cualquier formación o crecimiento tumoral adicional. Por ejemplo, los linfocitos T CAR de la invención pueden experimentar una expansión robusta de linfocitos T *in vivo* y persistir en niveles elevados durante un tiempo prolongado en la sangre y la médula ósea y formar linfocitos T de memoria específicos. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, los linfocitos con CAR se pueden diferenciar *in vivo* en un estado de tipo memoria central tras el encuentro y la posterior eliminación de las células diana que expresan el antígeno sustituto.

25 Sin desear quedar ligados a teoría alguna, la respuesta inmunitaria antitumoral inducida por los linfocitos T modificados con CAR puede ser una respuesta inmunitaria activa o pasiva. Además, la respuesta inmunitaria mediada por CAR puede ser parte de un enfoque de inmunoterapia adoptiva en el que los linfocitos T modificados con CAR inducen una respuesta inmunitaria específica hacia el dominio de unión a antígeno en el CAR. Por ejemplo, unas células CART19 provocan una respuesta inmunitaria específica contra las células que expresan CD19.

30 Si bien los datos divulgados en el presente documento describen específicamente el ARNm que comprende scFv anti-CD19 derivado del anticuerpo monoclonal murino FMC63 o scFv SS1 anti-mesotelina, junto con el dominio transmembrana y bisagra CD8 α humano y los dominios de señalización de CD2 y CD3zeta humanos, la invención se debe interpretar para incluir cualquier número de variaciones para cada uno de los componentes de la construcción tal como se describe en otra parte del presente documento, de acuerdo con lo permitido por el alcance de las reivindicaciones. Es decir, la invención incluye el uso de cualquier dominio de unión a antígeno en el CAR para generar una respuesta de linfocitos T mediada por CAR específica para el dominio de unión a antígeno. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno en el CAR de la invención puede dirigirse a un antígeno tumoral, como se define en las reivindicaciones.

35 Los cánceres que se pueden tratar incluyen tumores que no están vascularizados, o que aún no están vascularizados sustancialmente, así como tumores vascularizados. Los cánceres pueden comprender tumores no sólidos (tales como tumores hematológicos, por ejemplo, leucemias y linfomas) o pueden comprender tumores sólidos. Los tipos de cánceres a tratar con los CAR de la invención incluyen, pero sin limitación, carcinoma, blastoma y sarcoma, y ciertas leucemias o neoplasias linfoides, tumores benignos y malignos, y neoplasias, por ejemplo, sarcomas, carcinomas y melanomas. También se incluyen tumores/cánceres de adultos y tumores/cánceres pediátricos.

40 Los cánceres hematológicos son cánceres de la sangre o la médula ósea. Los ejemplos de cánceres hematológicos (o hematógenos) incluyen leucemias, incluyendo leucemias agudas (como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (tales como leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin (formas indolentes y de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de cadena pesada, síndrome mielodisplásico, tricoleucemia y mielodisplasia.

45 Los tumores sólidos son masas anómalas de tejido que generalmente no contienen quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos. Los diferentes tipos de tumores sólidos se nombran por el tipo de células que los forman (tales como los sarcomas, carcinomas y linfomas). Ejemplos de tumores sólidos, tales como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, osteosarcoma y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon,

neoplasia linfoide, cáncer pancreático, cáncer de mama, cánceres de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, feocromocitomas carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma
 5 broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer cervicouterino, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga, melanoma y tumores del SNC (tales como un glioma (como el glioma del tronco encefálico y los gliomas mixtos), astrocitoma de glioblastoma (también conocido como glioblastoma multiforme), linfoma del SNC, germinoma, meduloblastoma, schwannoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma,
 10 neuroblastoma, retinoblastoma y metástasis cerebral).

En una realización, la porción del resto de unión a antígeno del CAR de la invención es para usar en un método para tratar un cáncer particular, como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, el CAR diseñado para dirigirse a CD19 se puede usar en un método para tratar cánceres y trastornos que incluyen, pero sin limitación, pre-B ALL
 15 (indicación pediátrica), ALL adulto, linfoma de células del manto, linfoma difuso de linfocitos B grandes, rescate postrasplante alogénico de médula ósea y similares.

En otra realización, el CAR puede diseñarse para dirigirse a CD22 para usar en un método de tratamiento del linfoma difuso de linfocitos B grandes. En una realización, una combinación de CAR que se dirigen a CD19, CD20,
 20 CD22 y ROR1 puede usarse en un método para tratar cánceres y trastornos que incluyen pre-B ALL (indicación pediátrica), ALL adulto, linfoma de células del manto, linfoma difuso de linfocitos B grandes, rescate postrasplante alogénico de médula ósea y similares.

En una realización, el CAR puede diseñarse para dirigirse a la mesotelina para usar en un método de tratamiento de mesotelioma, cáncer pancreático, cáncer de ovario y similares. En otra realización, el CAR puede diseñarse para
 25 dirigirse a CD33/IL3Ra para usar en un método de tratamiento de leucemia mielógena aguda y similares. En una realización adicional, el CAR puede diseñarse para dirigirse a c-Met para usar en un método para tratar el cáncer de mama triple negativo, cáncer de pulmón no microcítico y similares.

En una realización, el CAR puede diseñarse para dirigirse a PSMA para usar en un método para tratar el cáncer de próstata y similares. En otra realización, el CAR puede diseñarse para dirigirse al Glicolípido F77 para usar en un
 30 método para tratar el cáncer de próstata y similares. En una realización adicional, el CAR puede diseñarse para dirigirse a EGFRvIII para usar en un método de tratamiento de glioblastoma y similares.

En una realización, el CAR puede diseñarse para apuntar a GD-2 para usar en un método de tratamiento del neuroblastoma, melanoma y similares. En otra realización, el CAR puede diseñarse para dirigirse a NY-ESO-1 TCR
 35 para usar en un método de tratamiento del mieloma, sarcoma, melanoma y similares. En una realización adicional, el CAR puede diseñarse para dirigirse a MAGE A3 TCR para usar en un método de tratamiento del mieloma, sarcoma, melanoma y similares.

40 Sin embargo, la invención no debe interpretarse como limitada únicamente a las dianas de antígeno y enfermedades desveladas en el presente documento. Más bien, la invención debe interpretarse como que incluye cualquier diana antigénica que esté asociada con una enfermedad en la que se pueda usar un CAR para tratar la enfermedad.

45 Los linfocitos T modificados con CAR de la invención también pueden servir como un tipo de vacuna para inmunización *ex vivo* y/o terapia *in vivo* en un mamífero, como se define en las reivindicaciones. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

Con respecto a la inmunización *ex vivo*, se produce *in vivo* al menos una de los siguientes antes de administrar la célula a un mamífero: i) expansión de las células, ii) introducción de un ácido nucleico que codifica un CAR a las
 50 células y/o iii) crioconservación de las células.

Los procedimientos *ex vivo* son bien conocidos en la técnica y se analizan más detalladamente a continuación. Resumiendo, las células se aíslan de un mamífero (preferentemente un ser humano) y se modifican genéticamente
 55 (es decir, se transducen o transfectan *in vitro*) con un vector que expresa un CAR divulgado en el presente documento. La célula modificada con CAR se puede administrar a un receptor mamífero para proporcionar un beneficio terapéutico. El receptor mamífero puede ser un ser humano y la célula modificada con CAR puede ser autóloga con respecto al receptor. Como alternativa, las células pueden ser alogénicas, singénicas o xenogénicas con respecto al receptor.

60 El procedimiento para la expansión *ex vivo* de las células madre y progenitoras hematopoyéticas descrito en la patente de EE. UU. n.º 5.199.942, se puede aplicar a las células de la presente invención. Otros métodos adecuados son conocidos en la técnica, por tanto, la presente invención no se limita a ningún método particular de expansión *ex vivo* de las células. Resumiendo, el cultivo y la expansión *ex vivo* de los linfocitos T comprende: (1) recoger células madre y progenitoras hematopoyéticas CD34+ de un mamífero a partir de sangre periférica o de explantes de
 65 médula ósea; y (2) expandir tales células *ex vivo*. Además de los factores de crecimiento celular descritos en la

patente de EE. UU. n.º 5.199.942, se pueden utilizar otros factores, tales como flt3-L, IL-1, IL-3 y ligando c-kit, para el cultivo y la expansión de las células.

5 Además de usar una vacuna basada en células en términos de inmunización *ex vivo*, la presente invención también proporciona composiciones para la inmunización *in vivo* para inducir una respuesta inmunitaria dirigida contra un antígeno en un paciente.

10 Generalmente, las células activadas y expandidas, como se describe en el presente documento, pueden utilizarse en el tratamiento y la prevención de enfermedades que surgen en individuos inmunocomprometidos. En particular, los linfocitos T modificados con CAR de la invención se usan en el tratamiento del cáncer. En determinadas realizaciones, las células de la invención se usan en el tratamiento de pacientes con riesgo de desarrollar cáncer. Por tanto, la presente invención proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de linfocitos T modificadas con CAR, como se define en las reivindicaciones, para usar en un método para tratar el cáncer. Los linfocitos T modificadas con CAR de la presente invención pueden usarse en el método para tratar el cáncer, en donde los
15 linfocitos T se administran solos o como una composición farmacéutica junto con diluyentes y/o con otros componentes, tales como IL-2 u otras citocinas o poblaciones celulares. Resumiendo, las composiciones farmacéuticas pueden comprender una población de células diana, como se describe en el presente documento, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos, tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos, tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes, tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente invención se formulan preferentemente para administración intravenosa.

25 Las composiciones farmacéuticas pueden usarse en un método para tratar una enfermedad en donde las composiciones farmacéuticas se administran de una manera adecuada para la enfermedad que se va a tratar (o prevenir). La cantidad y la frecuencia de la administración estarán determinadas por factores tales como la condición del paciente y el tipo y la gravedad de la enfermedad del paciente, aunque las dosis adecuadas pueden determinarse mediante ensayos clínicos.

30 Cuando se indica "una cantidad inmunológicamente eficaz", "una cantidad eficaz antitumoral", "una cantidad eficaz inhibidora de tumores" o una "cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones para usar en un método de tratamiento de una enfermedad puede determinarse por un personal médico, teniendo en cuenta las diferencias individuales de edad, peso, tamaño del tumor, grado de infección o metástasis y condición del paciente
35 (sujeto). En general, se puede afirmar que una composición farmacéutica que comprende los linfocitos T descritos en el presente documento puede usarse en un método para tratar una enfermedad, en donde el método comprende administrar una dosis de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, preferentemente de 10^5 a 10^8 células/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores enteros dentro de esos intervalos. Las composiciones de linfocitos T también pueden ser para el uso mencionado anteriormente, en donde el método comprende administrar múltiples veces en estas dosis, preferentemente comprende además la administración mediante el uso de técnicas de infusión que se conocen comúnmente en inmunoterapia (véase, por ejemplo, Rosenberg *et al.*, *New Eng. J. of Med.* 319:1676, 1988). Un experto en la técnica de la medicina puede determinar fácilmente la dosificación óptima y el régimen de tratamiento para un paciente en particular, controlando al paciente en busca de signos de enfermedad y ajustando el tratamiento en consecuencia.

45 En determinadas divulgaciones, se puede desear administrar linfocitos T activados a un sujeto y a continuación, volver a extraer sangre (o realizar una aféresis) posteriormente, activar los linfocitos T a partir de la misma y reinfundir al paciente estos linfocitos T activados y expandidos. Este proceso se puede llevar a cabo varias veces cada pocas semanas. En determinadas divulgaciones, los linfocitos T se pueden activar a partir de extracciones de
50 sangre de 10 ml a 400 ml. En determinadas divulgaciones, los linfocitos T se activan a partir de extracciones de sangre de 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 60 ml, 70 ml, 80 ml, 90 ml o 100 ml. Sin desear quedar ligado a la teoría, el uso de este protocolo de extracción múltiple/reinfusión múltiple de sangre puede servir para seleccionar ciertas poblaciones de linfocitos T. En el contexto del uso médico descrito en el presente documento, la administración de las composiciones se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente, incluso por inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser para usar en un método para tratar una enfermedad, en donde el método comprende la administración a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodular, intramedular, intramuscular, por inyección intravenosa (i.v.) o por vía intraperitoneal. Las composiciones de linfocitos T descritas en el presente documento pueden usarse en un método para tratar una enfermedad en donde el método comprende la administración a un
60 paciente mediante inyección intradérmica o subcutánea. En el contexto de los usos médicos descritos en el presente documento, las composiciones de linfocitos T de la presente invención se administran preferentemente por inyección i.v. En el contexto de los usos médicos descritos en el presente documento, las composiciones de linfocitos T se pueden inyectar directamente en un tumor, ganglio linfático o sitio de infección.

65 En el contexto de los usos médicos descritos en el presente documento, las células activadas y expandidas usando los métodos descritos en el presente documento u otros métodos conocidos en la técnica donde los linfocitos T se

expanden a niveles terapéuticos, se administran a un paciente (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) junto con cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, incluyendo, pero sin limitación, el tratamiento con agentes tales como terapia antivírica, cidofovir e interleucina-2, tratamiento con citarabina (también conocido como ARA-C) o natalizumab para pacientes con EM o el tratamiento con efalizumab para pacientes con psoriasis u otros tratamientos para pacientes con LMP. En el contexto de los usos médicos descritos en el presente documento, los linfocitos T de la invención se pueden usar en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoblivos tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias de anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiación. Estos fármacos inhiben la calcineurina fosfatasa dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la p70S6 quinasa que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina) (Liu *et al.*, Cell 66:807-815, 1991; Henderson *et al.*, Immun. 73:316-321, 1991; Bierer *et al.*, Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). En el contexto de los usos médicos descritos en el presente documento, las composiciones celulares de la presente invención se administran a un paciente (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) junto con un trasplante de médula ósea. La terapia de ablación de linfocitos T usando cualquiera de los agentes de quimioterapia, tales como, fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. En el contexto de los usos médicos descritos en el presente documento, las composiciones celulares de la presente invención se administran después de una terapia ablativa de linfocitos B, tal como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, los sujetos se pueden someter a un tratamiento convencional con altas dosis de quimioterapia seguida de trasplante de células madre de sangre periférica. En el contexto de los usos médicos descritos en el presente documento, después del trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunitarias expandidas de la presente invención. Además, las células expandidas se pueden administrar antes o después de la cirugía. En el contexto de los usos médicos descritos en el presente documento, la dosificación de los tratamientos anteriores a administrar a un paciente variará con la naturaleza precisa de la afección que se esté tratando y con el receptor del tratamiento. La escala de las dosis para la administración humana se puede realizar de acuerdo con las prácticas aceptadas en la técnica. La dosis para CAMPATH, por ejemplo, generalmente estará en el intervalo de 1 a aproximadamente 100 mg para un paciente adulto, habitualmente, se administra diariamente durante un período de entre 1 y 30 días. La dosis diaria preferida es de 1 a 10 mg por día, aunque en algunos casos se pueden usar dosis mayores de hasta 40 mg por día (descritas en la patente de EE. UU. n.º 6120766).

30 EJEMPLOS EXPERIMENTALES

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La invención se describe adicionalmente en detalle por referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos y no están destinados a ser limitantes a menos que se especifique lo contrario.

Sin más descripción, se cree que un experto en la materia puede, utilizando la descripción anterior y los siguientes ejemplos ilustrativos, preparar y utilizar los compuestos de la presente invención y practicar los métodos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo, por lo tanto, señalan específicamente las realizaciones preferidas de la presente invención, y no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera el resto de la divulgación.

Ejemplo 1: Uso del dominio de señalización de CD2 en receptores de antígenos quiméricos de segunda generación

La incorporación de dominios coestimuladores en receptores de antígenos quiméricos puede aumentar la producción de citocinas y la destrucción de células diana. CD2 es una molécula coestimuladora que puede influir en la señalización mediada por calcio. En el presente documento se examina si la inclusión del dominio intracelular CD2 en los CAR influye en la entrada/señalización de calcio y en la producción de citocinas.

Los materiales y métodos empleados en estos experimentos se describen a continuación.

CAR que contienen CD2

El dominio coestimulador de CD2 se clonó en diversos CAR específicos de CD19 o mesotelina. Por ejemplo, la Figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos para el CAR antiCD19-CD2z (SEQ ID NO: 1).

Linfocitos T

Se obtuvieron muestras de sangre del Human Immunology Core de la Universidad de Pensilvania. Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ se aislaron negativamente usando los kits RosetteSep (Stem cell Technologies). Las células se cultivaron en medios RPMI 1640 suplementados con FCS al 10 %, 100-U/ml de penicilina, 100 µg/ml de sulfato de estreptomycin, Hepes 10 mM, en una incubadora a 37 °C y CO₂ al 5 %. Para la estimulación, los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ se cultivaron con una combinación de perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos αCD2 (T11.1 y T11.2), αCD3 (OKT3) y αCD28 (9.3).

Electroporación de ARNm

Se sometieron a electroporación linfocitos T humanos con ARNm para expresar el dominio CD28:CD3zeta o los dominios CD28:CD2:CD3zeta o CD2:CD3zeta. Además, los CAR se prepararon para expresar solo los dominios CD2, CD28 o CD3zeta. Los linfocitos T del donante se sometieron a electroporación con ARNm de CAR mediante los siguientes métodos. El día 10 de cultivo, los linfocitos T activados con perlas magnéticas se recogieron y sometieron a electroporación. Se utilizaron dos sistemas de electroporación: BTX CM830 (aparato BTX de Harvard, Holliston, Massachusetts, EE. UU.) y Maxcyte (Maxcyte Inc, Rockville, Maryland, EE. UU.). Para la electroporación utilizando BTX EM830, los linfocitos T sometidos a electroporación se lavaron tres veces con OPTI-MEM (Invitrogen) y se resuspendieron en OPTI-MEM a la concentración final de $1-3 \times 10^8$ /ml. Posteriormente, se mezclaron 0,1 a 0,2 ml de las células con 10 μ g/0,1 ml de linfocitos T de IVT ARN (o según se indique) y se sometieron a electroporación en una cubeta de 2 mm (Harvard Apparatus BTX, Holliston, Massachusetts, EE. UU.). Para la electroporación usando Maxcyte, se siguió el manual de instrucciones utilizando la cámara de procesamiento OC-400 (Maxcyte Inc, Rockville, Maryland, EE. UU.) con programas integrados. La expresión de los CAR se verificó mediante citometría de flujo. Las células se lavaron y suspendieron en tampón FAC (PBS más azida de sodio al 0,1 % y BSA al 0,4 %). Se añadieron anticuerpos policlonales de cabra anti-F(ab)2 de ratón marcados con biotina (anti-Fab, Jackson Immunoresearch, West Grove, Pensilvania) al tubo y las células se incubaron a 4 °C durante 25 minutos y se lavaron dos veces. A continuación, las células se tiñeron con estreptavidina marcada con ficoeritrina (BD Pharmingen, San Diego, California).

Secreción de citocinas

Las células diana K562 que expresan mesotelina o CD19 se lavaron y suspendieron a 10^6 células/mL en R10. Se añadieron cien mil de cada tipo de célula diana a cada uno de los 2 pocillos de una placa de fondo redondo de 96 pocillos (Corning). Los cultivos de linfocitos T efectores se lavaron y suspendieron a 10^6 células/ml en R10. Se combinaron cien mil linfocitos T efectores con células diana en los pocillos indicados de la placa de 96 pocillos. Además, se prepararon pocillos que contenían linfocitos T solos. Las placas se incubaron a 37 °C durante 18 a 20 horas. Después de la incubación, el sobrenadante se recogió y se sometió a un ensayo ELISA para IL-2 e IFN-gamma utilizando métodos estándar (Pierce, Rockford, Illinois).

Lisis de dianas específicas

los linfocitos T CAR electroporados con ARNm se cultivaron conjuntamente con diversas líneas de células cancerosas y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la lisis de dianas específicas.

Medición de la entrada de calcio

Se cargaron linfocitos T CAR electroporados con ARNm con indo-1 y se estimularon con proteína de fusión mesotelina-Fc. La entrada de calcio en las células se midió después de la estimulación, observando la relación del calcio unido respecto al libre.

Los resultados de los experimentos se describen a continuación.

Resultados

Se obtuvieron linfocitos T CD4 y CD8 normales de donantes humanos y se estimularon con una combinación de perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos α CD2 (T11.1 y T11.2), α CD3 (OKT3) y α CD28 (9.3). Después de la estimulación, la proliferación celular se evaluó observando el número absoluto de células y las duplicaciones de población, si bien la activación celular se evaluó midiendo el tamaño celular. La activación por señales de CD2/CD3 induce suficientemente la activación celular y la proliferación celular de las poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 (Figura 2).

Los linfocitos T humanos se sometieron a electroporación con ARNm para diversas construcciones de CAR, conteniendo o no el dominio de señalización de CD2. Los linfocitos T sometidos a electroporación de ARNm se cultivaron conjuntamente durante 24 horas con células tumorales diana, después de lo cual se midió la secreción de citocinas. La secreción de IL-2 e IFN- γ aumenta en SS1-CD2z, similar a lo observado en SS1-28z. Sin embargo, La secreción de IL-2 e IFN- γ está disminuida en SS1-28CD2z. De manera similar, anti-CD19-CD2z produce similares IL-2 e IFN- γ , en comparación con anti-CD19-z y anti-CD19-28z, pero la secreción de IL-2 e IFN- γ está disminuida en los CAR anti-CD19-28CD2z (Figura 3). La observación de que los dominios de señalización de CD2 permiten que los linfocitos T CAR proliferen al tiempo que disminuyen la secreción de citocinas puede ser importante en algunos casos terapéuticos. Por ejemplo, en un caso, un paciente con leucemia tratado con un CAR CD19 que contenía un dominio de señalización de CD28 falleció debido a los altos niveles de citocinas (Brentjens *et al.*, 2010, Mol Ther, 8(4):666-8). De manera similar, un paciente con cáncer de colon falleció poco después de que le inyectaran linfocitos T CAR her2/neu que contenían un dominio de señalización de CD28 (Morgan *et al.*, 2010, Mol Ther, 18(4):843-51).

Para evaluar la capacidad de eliminar tumores de los CAR que contienen CD2, los linfocitos T sometidos a electroporación de ARNm se cultivaron conjuntamente con células tumorales diana en relaciones variables de efector respecto a diana. Después de 4 horas de cultivo conjunto, los CAR anti-CD19-CD2z eliminaron de manera

eficaz las células tumorales K562-CD19, si bien los CAR SS1-CD2z eliminaron eficazmente las células tumorales K562-meso. Además, después de 18 horas de cultivo conjunto, SS1-CD2z mostró destrucción eficaz de células tumorales K562-meso (Figura 4).

- 5 Para evaluar las señales de calcio, se cargaron linfocitos T electroporados con ARNm de CAR con indicador de calcio Indo-IAM y se estimularon con proteína de fusión mesotelina-Fc (30 segundos después del registro). La relación de calcio unido respecto al libre se registró a lo largo del tiempo. La inclusión del dominio de señalización de CD2 suprime el flujo de calcio, como puede observarse por la reducción en la entrada de calcio en SS1-28CD2z en comparación con SS1-28z (sin CD2) (Figura 5). Al tiempo que sin pretender quedar ligado a teoría alguna en particular, la observación de que la señalización CD2 disminuye el flujo de calcio probablemente esté relacionada causalmente con la disminución de la secreción de citocinas. Esto puede ser importante en algunos casos terapéuticos. Por ejemplo, en un caso, un paciente con leucemia tratado con un CAR CD19 que contenía un dominio de señalización de CD28 falleció debido a los altos niveles de citocinas (Brentjens *et al.*, 2010, *Mol Ther*, 8(4):666-8). De manera similar, un paciente con cáncer de colon falleció poco después de que le inyectaran linfocitos T CAR her2/neu que contenían un dominio de señalización de CD28 (Morgan *et al.*, 2010, *Mol Ther*, 18(4):843-51).

10 Los resultados presentados en el presente documento muestran que los CAR de CD2z inducen la producción de citocinas a la par que los CAR de 28z, demuestran una ventaja de proliferación sobre los CAR de primera generación (z-solo) y presentan una respuesta de flujo de calcio intermedia entre lo que se observó para 28z y BBz (Figura 6).

15 Es en el presente documento donde se informa que el uso del dominio de señalización de CD2 en los CAR de segunda generación influye en la producción de IL-2 e IFN- γ de linfocitos T con CAR y presenta una lisis de células diana similar. Estos resultados demuestran que el CD2 se puede utilizar en moléculas CAR de segunda generación para alterar la producción de citocinas de los linfocitos T con CAR, tanto en direcciones negativas como positivas y puede tener implicaciones para la sostenibilidad y eficacia de los linfocitos T con CAR en microambientes tumorales *in vivo*, alterando la supervivencia de los linfocitos T con CAR y los umbrales de muerte celular inducida por la activación. Dada la alta autoactivación del CAR SS-128z, SS1-CD2z puede ser un CAR más tolerable para el ataque de mesotelina tumoral *in vivo* y puede disminuir la muerte celular inducida por la activación.

30

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización de CD3 zeta, en donde la región de señalización coestimuladora comprende un dominio de señalización de CD2 y comprende además el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28.
2. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) aislado que comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización de CD3 zeta, en donde la región de señalización coestimuladora comprende un dominio de señalización de CD2 y comprende además el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28.
3. Un linfocito T que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización de CD3 zeta, en donde el dominio de señalización coestimulador comprende un dominio de señalización de CD2 y comprende además el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28.
4. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización de CD3 zeta, en donde la región de señalización coestimuladora comprende un dominio de señalización de CD2 y comprende además el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28.
5. La secuencia de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, el CAR aislado de la reivindicación 2, el linfocito T de la reivindicación 3 o el vector de la reivindicación 4, en donde el dominio de unión a antígeno es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
6. La secuencia de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, el CAR aislado de la reivindicación 2, el linfocito T de la reivindicación 3 o el vector de la reivindicación 4, en donde el dominio de unión a antígeno se une a un antígeno tumoral.
7. El linfocito T de la reivindicación 3, en donde el linfocito T se selecciona del grupo que consiste en un linfocito T citotóxico (CTL) y un linfocito T regulador.
8. El linfocito T de la reivindicación 3, en donde el linfocito T presenta una inmunidad antitumoral cuando el dominio de unión a antígeno se une a su antígeno correspondiente.
9. Un linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR para usar en un método de
 - a) terapia de una enfermedad, en donde el método comprende estimular una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T a una población celular o tejido diana en un mamífero, comprendiendo el método administrar a un mamífero una cantidad eficaz del linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora que comprende un dominio de señalización de CD2 y el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28 y un dominio de señalización de CD3 zeta y en donde el dominio de unión a antígeno se selecciona para reconocer específicamente la población celular o tejido diana; o
 - b) tratamiento de un tumor en un mamífero, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad eficaz de un linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora que comprende un dominio de señalización de CD2 y el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28 y un dominio de señalización de CD3 zeta, proporcionando así una inmunidad antitumoral en el mamífero; o
 - c) tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección que es cáncer en un mamífero, en donde la enfermedad, trastorno o afección se asocia con una expresión elevada de un antígeno tumoral, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad eficaz de un linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora que comprende un dominio de señalización de CD2 y el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28 y un dominio de señalización de CD3 zeta, tratando así el mamífero.
10. El linfocito T modificado genéticamente para usar como en la reivindicación 9(c), en donde el linfocito T es un linfocito T autólogo.
11. El linfocito T modificado genéticamente para usar como en la reivindicación 9(c), en donde el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, glucolípidos F77, EGFRvIII, GD-2, TCR de NY-ESO-1, TCR de MAGE A3 y cualquier combinación de los mismos.

12. Un linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR para usar en un método de tratamiento del cáncer, en donde
- 5 a) el método comprende administrar a un ser humano con cáncer el linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora que comprende un dominio de señalización de CD2 y el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28 y un dominio de señalización de CD3 zeta; o
- 10 b) el método comprende generar una población persistente de linfocitos T modificados genéticamente en un ser humano diagnosticado con cáncer, en donde el linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR se administra al ser humano, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora que comprende un dominio de señalización de CD2 y el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28 y un dominio de señalización de CD3 zeta, en donde la población persistente de linfocitos T genéticamente modificados persiste en el ser humano durante al menos un mes después de la administración; o
- 15 c) expandir una población de linfocitos T modificados genéticamente en un ser humano diagnosticado con cáncer, en donde el linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR se administra al ser humano, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora que comprende un dominio de señalización de CD2 y el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28 y un dominio de señalización de CD3 zeta, en donde el linfocito T modificado genéticamente administrado produce una población de linfocitos T de progenie en el ser humano.
- 20
13. El linfocito T modificado genéticamente para usar como en la reivindicación 12(a), en donde el ser humano es resistente a al menos un agente quimioterapéutico.
- 25
14. El linfocito T modificado genéticamente para usar como en la reivindicación 12(b), en donde la población persistente de linfocitos T genéticamente modificados comprende un linfocito T de memoria o al menos una célula seleccionada del grupo que consiste en un linfocito T que se administró al ser humano, una progenie de un linfocito T que se administró al ser humano y una combinación de los mismos.
- 30
15. El linfocito T modificado genéticamente para usar como en la reivindicación 12(b), en donde la población persistente de linfocitos T modificados genéticamente persiste en el ser humano durante al menos tres meses después de la administración o durante al menos cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, dos años o tres años después de la administración.
- 35
16. El linfocito T modificado genéticamente para usar como en la reivindicación 12(c), en donde los linfocitos T de la progenie en el ser humano comprenden un linfocito T de memoria.
- 40
17. El linfocito T modificado genéticamente para usar como en la reivindicación 12(c), en donde el linfocito T es un linfocito T autólogo.
- 45
18. El linfocito T modificado genéticamente para usar como en la reivindicación 12(c), en donde la población de linfocitos T de la progenie persiste en el ser humano durante al menos tres meses después de la administración o durante al menos cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, dos años o tres años después de la administración.
- 50
19. Un método *in vitro* para reducir la cantidad de citocina secretada por un linfocito T, comprendiendo dicho método la modificación por ingeniería genética del linfocito T para expresar un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de dominio coestimulador que comprende un dominio de señalización de CD2 y el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28 y un dominio de señalización de CD3 zeta.
- 55
20. El método *in vitro* de la reivindicación 19, en donde la reducción de la cantidad de citocina secretada por un linfocito T reduce la proliferación de linfocitos T reguladores.
- 60
21. Un método *in vitro* para reducir la cantidad de entrada de calcio inducida por la activación en un linfocito T, comprendiendo dicho método la modificación por ingeniería genética del linfocito T para expresar un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de dominio coestimulador que comprende un dominio de señalización de CD2 y el dominio intracelular de una molécula coestimuladora CD28 y un dominio de señalización de CD3 zeta.
- 60
22. El método *in vitro* de la reivindicación 21, en donde la reducción de la cantidad de entrada de calcio inducida por la activación en el linfocito T impide la muerte celular del linfocito T inducida por la activación.

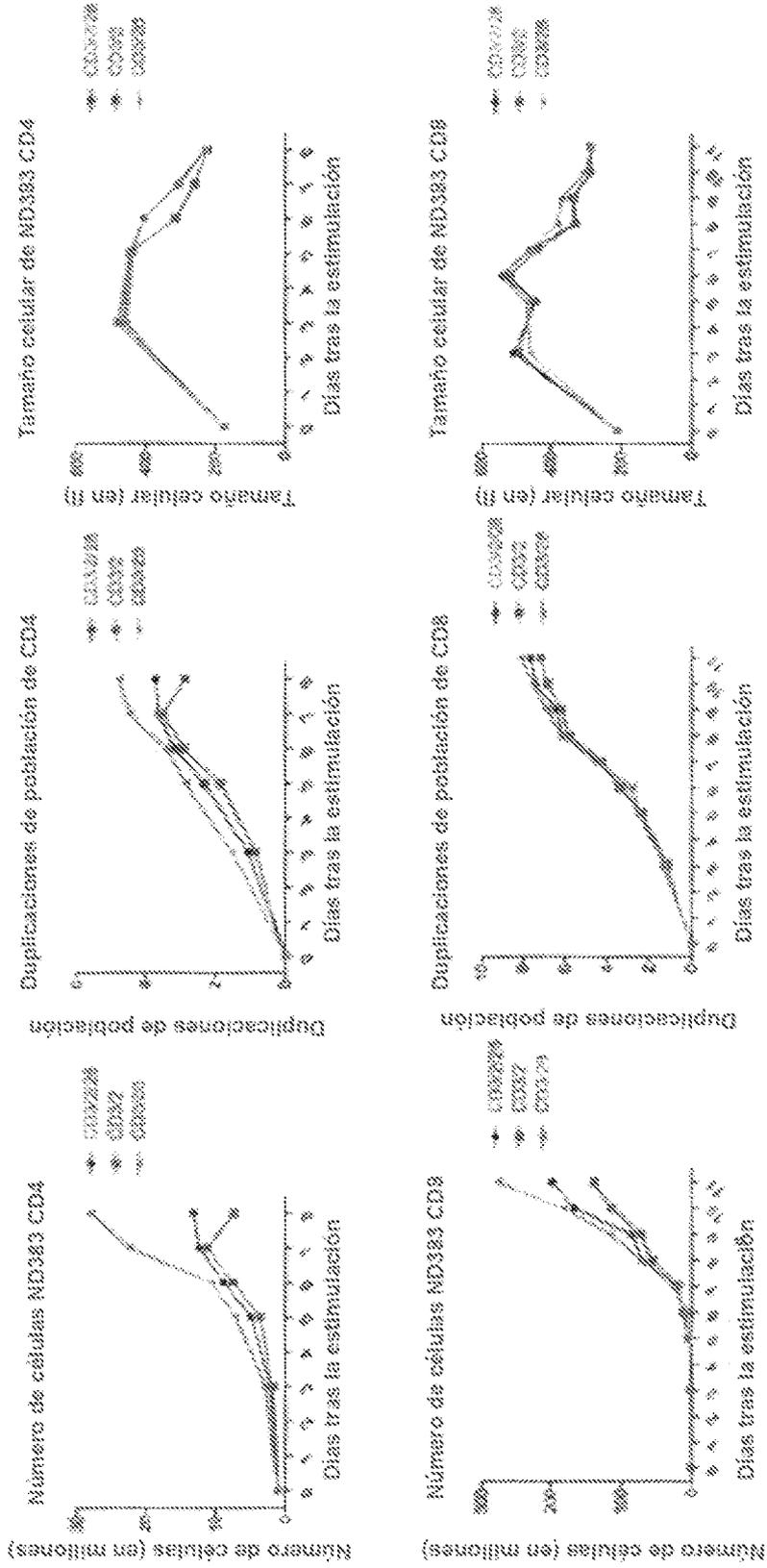


Figura 2

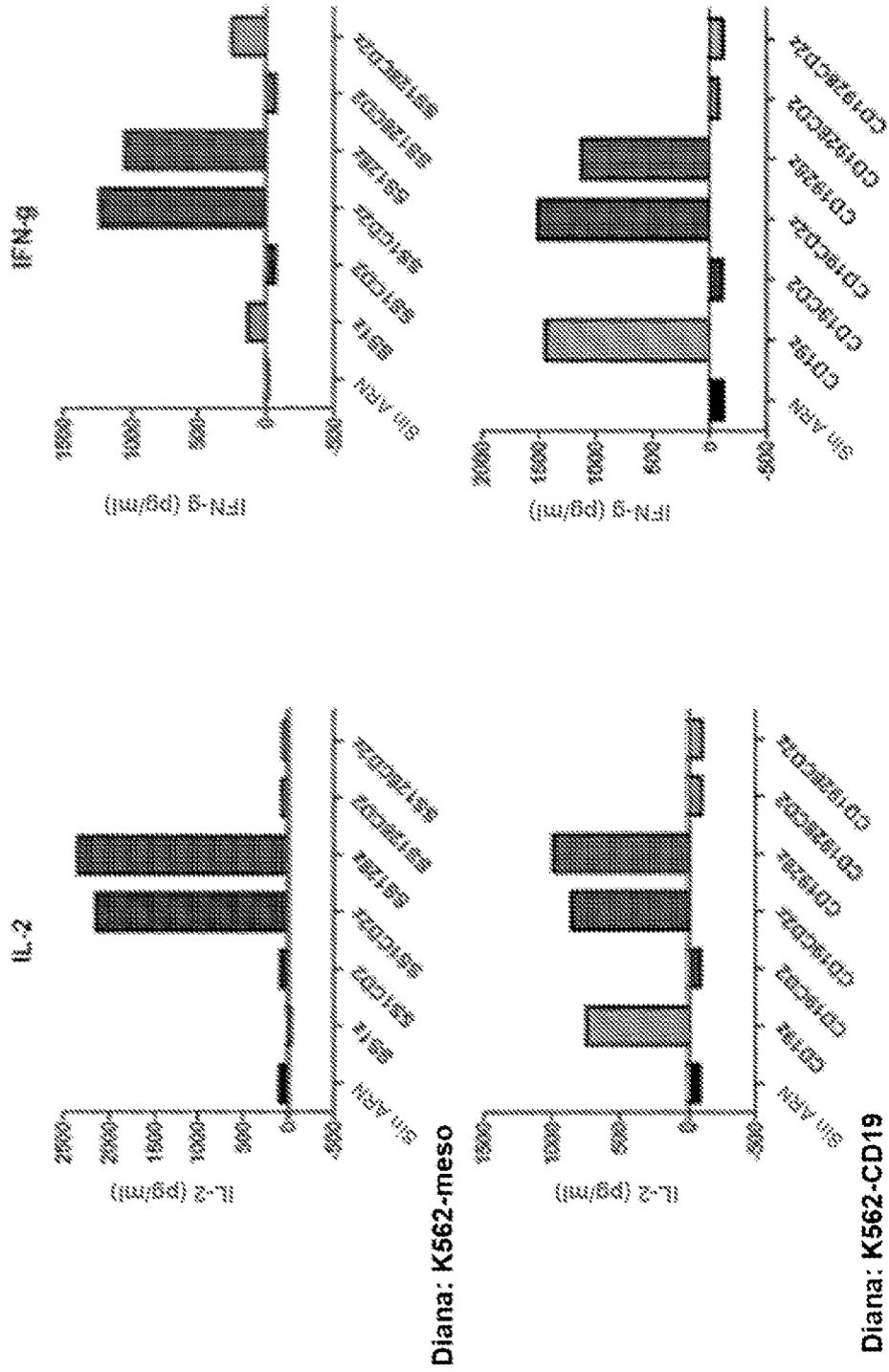


Figura 3

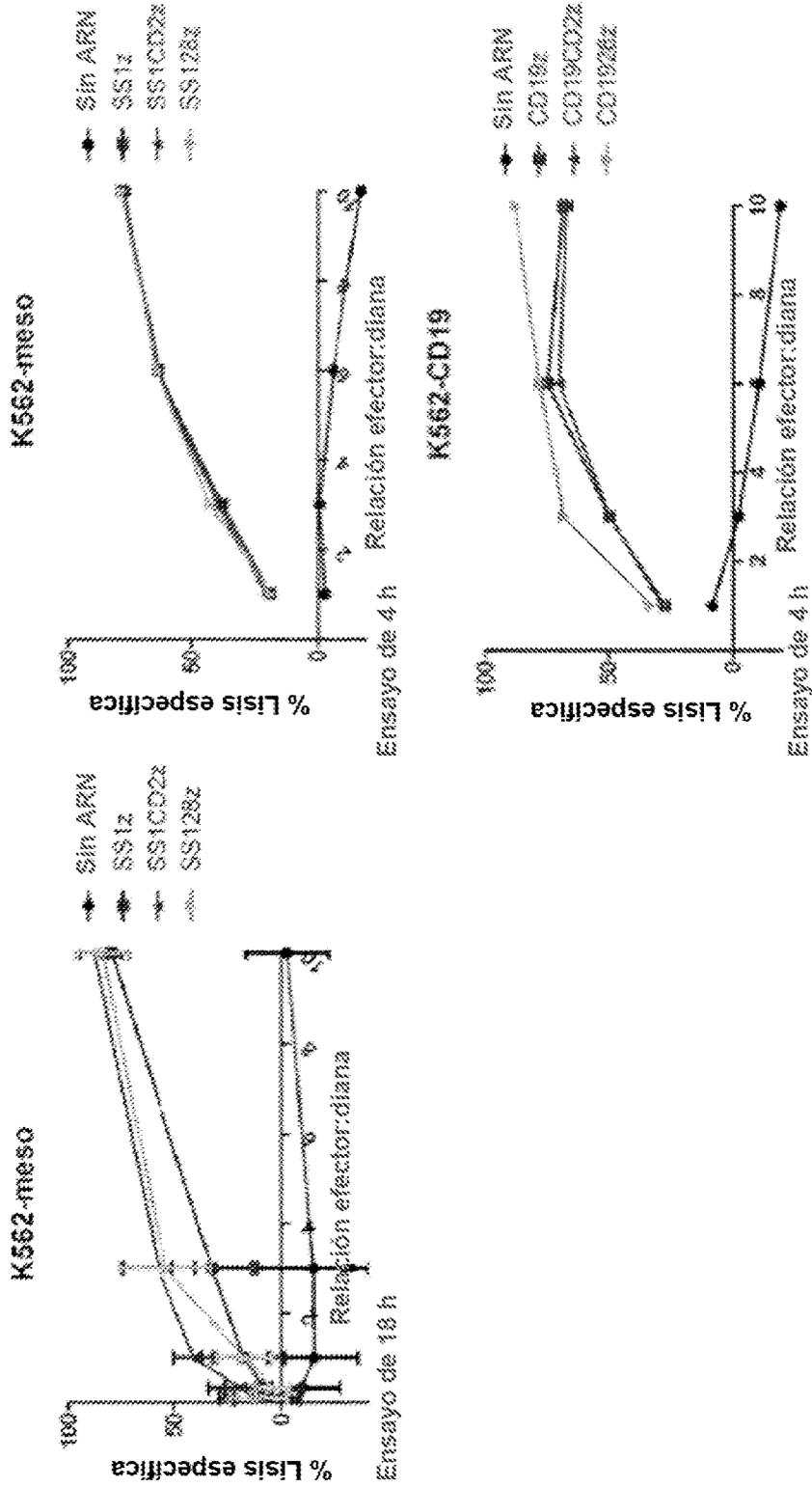


Figura 4

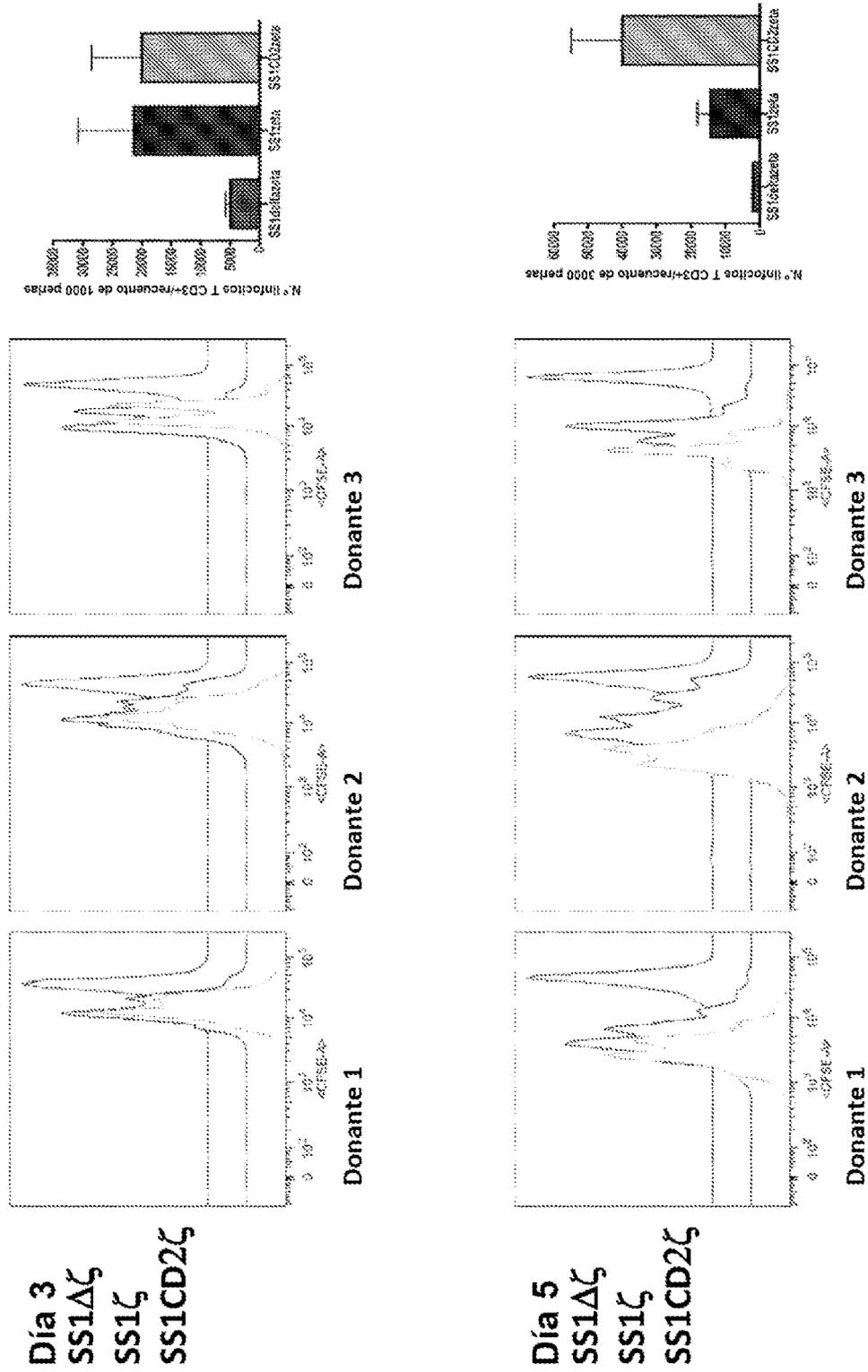


Figura 5

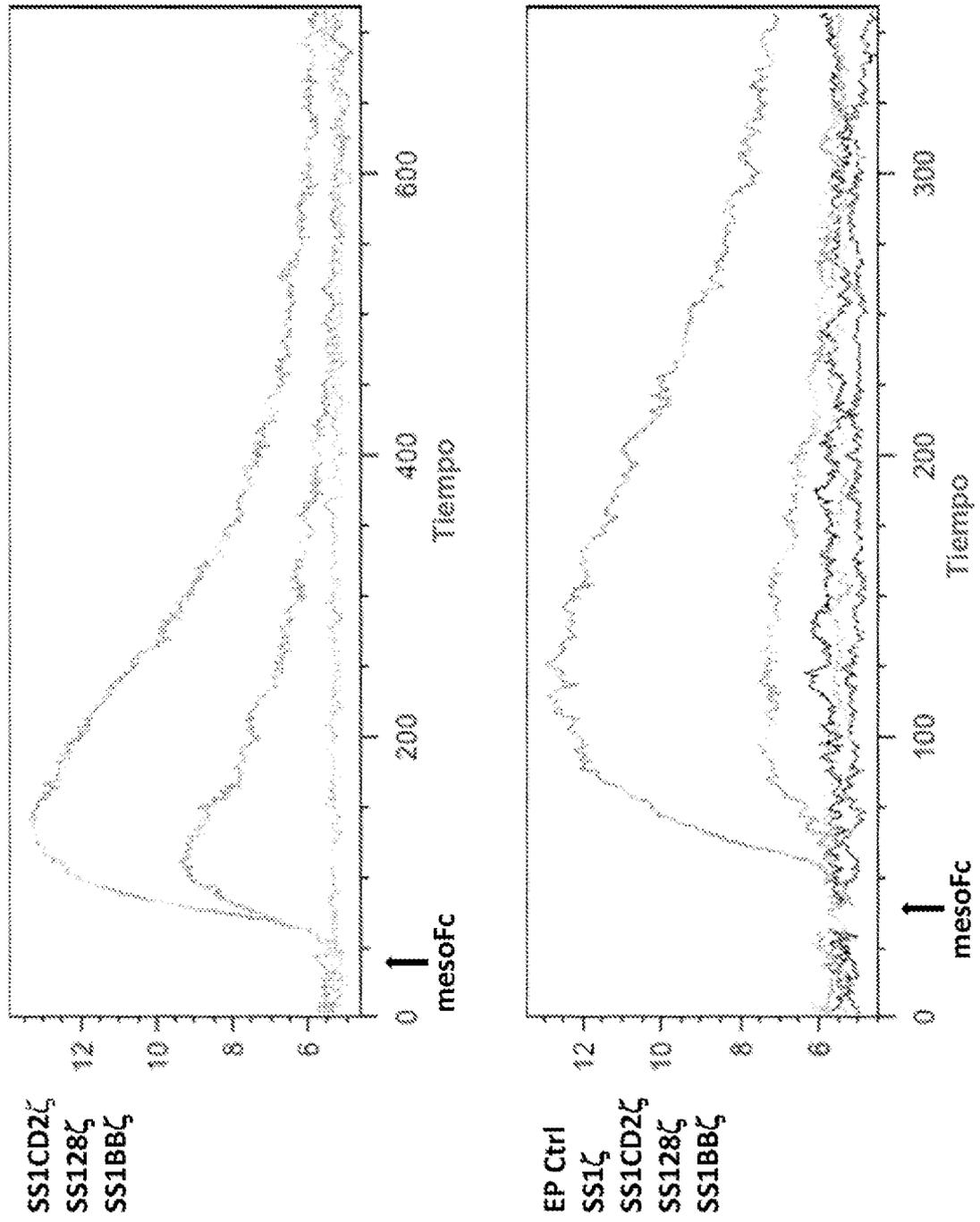


Figura 6