

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 004**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 35/14 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2014** **PCT/US2014/022137**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014** **WO14138704**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2014** **E 14719888 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018** **EP 2964753**

54 Título: **Dirección a CD138 en cáncer**

30 Prioridad:

07.03.2013 US 201361774040 P

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

04.06.2018

73 Titular/es:

BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE (100.0%)

One Baylor Plaza

Houston, TX 77030-3411, US

72 Inventor/es:

DOTTI, GIANPIETRO;

RAMOS, CARLOS, A. y

SAVOLDI, BARBARA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 671 004 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

Dirección a CD138 en cáncer

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N.º de Serie 61/774.040, presentada el 7 de marzo de 2013, que se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad.

10

Campo técnico

Las realizaciones de la presente divulgación se refieren al menos a los campos de la terapia celular, inmunología, inmunoterapia, biología molecular, biología celular y medicina, incluyendo oncología.

15

Antecedentes

En los últimos 15 años, el uso de quimioterapia de alta dosis y rescate de células madre, talidomida, lenalidomida y bortezomib ha prolongado la supervivencia de los enfermos de mieloma múltiple (MM) (la supervivencia a los 10 años es de aproximadamente el 30 %). Sin embargo, la enfermedad sigue siendo esencialmente incurable. Las células plasmáticas (CP) malignas son sensibles al reconocimiento y la eliminación inmunitarias por linfocitos T como indica la regresión tumoral mediada por los efectos de injerto contra MM en pacientes tratados con trasplante de células madre alogénicas mieloablativo o no mieloablativo. Esta observación ha estimulado el desarrollo de terapias de linfocitos T adoptivas basadas en la generación *ex vivo* de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de tumor en esta enfermedad dirigidos a varios antígenos asociados a tumor (AAT) que se sobreexpresan en CP neoplásicas.

20

25

La tecnología de receptores de antígenos quiméricos (CAR) en neoplasias malignas hematológicas ha aumentado exponencialmente en los últimos años. Los CAR son receptores artificiales compuestos del fragmento variable monocatenario (scFv) obtenido de un anticuerpo monoclonal específico (sitio de unión a antígeno), unido a los dominios intracitoplasmáticos de la cadena CD3ζ y endodominios coestimulantes. Cuando son expresados por linfocitos T, los CAR median simultáneamente en el reconocimiento de antígenos sin restricción de MHC y coestimulación de linfocitos T.

30

Para dirigirse a CP malignas usando tecnología de CAR, se seleccionó la molécula de CD138 (sindecano 1) que se sobreexpresa de forma invariable en la superficie celular de CP malignas. Este antígeno diana se ha validado para MM por intentos sucesivos de desarrollar anticuerpos monoclonales humanizados específicos de CD138, que han producido informes preliminares prometedores en ensayos clínicos. La combinación de la especificidad de anticuerpo de CD138 con citotoxicidad y longevidad de linfocitos T usando la tecnología de CAR debería representar un avance terapéutico significativo.

35

40

Aunque CD138 se localiza fisiológicamente en superficies basolaterales en células epiteliales sencillas y rodea células epiteliales estratificadas, la administración de anticuerpos monoclonales de CD138 a enfermos de MM ha demostrado ser segura, probablemente porque la densidad de expresión de CD138 en estos tejidos normales es baja. Sin embargo, la expresión de anticuerpo de CD138 como un CAR en linfocitos T puede aumentar la avidéz del anticuerpo y aportar mecanismos efectores de linfocitos T adicionales, provocando de este modo las toxicidades "en diana" pero "fuera de órgano" ya observadas para otros CAR que se dirigen a antígenos expresados a bajos niveles en tejidos normales. El efecto indeseado puede evitarse si se eliminan rápidamente linfocitos T de CAR mediante la activación de un gen suicida eficaz o reducirse si el CAR es expresado solamente de forma transitoria por linfocitos T, por ejemplo después de transfección de ARNm. Sin embargo, incluso si ambos enfoques aumentan la seguridad, anulan la principal ventaja de la terapia de linfocitos T adoptiva, que es el control inmunitario a largo plazo de la enfermedad.

45

50

La presente divulgación satisface una necesidad en la técnica de proporcionar terapia de linfocitos T adoptiva eficaz para individuos con cáncer que expresa CD138, incluyendo al menos MM.

55

Breve resumen

La presente divulgación se dirige a métodos y composiciones relacionados con la terapia celular. En realizaciones particulares, la terapia celular es para un individuo que necesite terapia celular, tal como un mamífero, incluyendo un ser humano. La terapia celular puede ser adecuada para cualquier afección médica, aunque en realizaciones específicas la terapia celular es para cáncer. El cáncer puede ser de cualquier tipo y de cualquier estadio. El individuo puede ser de cualquier edad o cualquier sexo. En realizaciones específicas, se sabe que el individuo tiene cáncer, está en riesgo de tener cáncer o se sospecha que tiene cáncer. El cáncer puede ser un cáncer primario o metastásico y el cáncer puede ser refractario al tratamiento. El individuo puede haber tenido una recaída del cáncer. En realizaciones específicas, el cáncer es una neoplasia hematológica, tal como una neoplasia hematológica de

60

65

linaje B. En algunos casos, el cáncer no es una neoplasia hematológica. En algunos casos, el cáncer es un mieloma, incluyendo mieloma múltiple. En realizaciones específicas, el cáncer es leucemia, linfoma, mieloma, cáncer de mama, de pulmón, de cerebro, de colon, de riñón, de próstata, pancreático, de tiroides, de hueso, de cuello uterino, de bazo, anal, esofágico, de cabeza y cuello, de estómago, de vesícula biliar, melanoma, de pulmón no microcítico, etc., por ejemplo. En aspectos particulares, el cáncer expresa uno o más antígenos tumorales y, en realizaciones específicas, la terapia celular se dirige al o a los antígenos tumorales. En realizaciones particulares, el antígeno tumoral es CD138 (que también puede denominarse sindecano 1).

En realizaciones particulares de la divulgación, hay métodos y composiciones relacionados con células adecuadas para su uso en inmunoterapia. En determinados aspectos, los métodos y composiciones de la divulgación son una mejora en técnicas utilizadas en este campo. En casos específicos, las realizaciones de la divulgación son útiles para mejoras en células utilizadas para inmunoterapia de cualquier tipo, aunque en casos particulares las células inmunoterapéuticas se emplean para terapia de cáncer.

En determinados aspectos de la divulgación, se proporcionan al individuo células que proporcionan terapia al individuo. Las células pueden ser de cualquier tipo, pero en realizaciones específicas las células son capaces de proporcionar terapia a un individuo que tenga células cancerosas que expresen en antígeno CD138. En determinadas realizaciones las células se proporcionan a un individuo que se sabe que tiene un cáncer que expresa CD138, tal como una neoplasia hematológica de linaje B, tal como mieloma múltiple, aunque en ciertos casos la presencia del antígeno CD138 no está determinada. Las células pueden ser células inmunitarias, tales como linfocitos T. Las células pueden ser linfocitos T citotóxicos (CTL), linfocitos NK, linfocitos NKT, etc., en algunos casos.

En realizaciones de la divulgación, hay métodos y composiciones relacionados con vectores terapéuticos y/o células que albergan los vectores. En aspectos de la divulgación, las células terapéuticas de la divulgación se dirigen a determinadas células cancerosas que comprenden el antígeno CD138 pero no se dirigen a otras células que tienen el antígeno CD138, y dicha dicotomía es el resultado de expresión específica ambiental del receptor de CD138 en las células terapéuticas. En realizaciones específicas, los métodos y composiciones de la divulgación se refieren a células que tienen un receptor de antígeno quimérico específico de CD138 cuya expresión está bajo el control de regulación específica de ambiente. En realizaciones específicas el ambiente es hipoxia. En determinadas realizaciones, los métodos y composiciones de la divulgación se refieren a células que tienen un receptor de antígeno quimérico específico de CD138 cuya expresión está bajo el control de regulación específica de tejido. En algunos casos, los materiales comprenden un gen suicida además de o como alternativa a la regulación ambiental y/o regulación específica de tejido.

En determinados aspectos de la divulgación, cualquier CAR, incluyendo uno distinto de CD138, se utiliza en la divulgación con regulación específica de hipoxia. Los CAR ejemplares como alternativa a CD138 o además de CD138 incluyen los específicos para un antígeno seleccionado del grupo que consiste en antígeno asociado a melanoma (MAGE), antígeno de melanoma expresado de forma preferente (PRAME), survivina, CD19, CD20, CD22, cadena ligera k, CD30, CD33, CD123, CD38, ROR1, ErbB2, ErbB3/4, dímeros de ErbB, EGFr VIII, antígeno carcinoembrionario, EGP2, EGP40, mesotelina, TAG72, PSMA, ligandos de NKG2D, B7-H6, receptor de IL-13 a2, MUC1, MUC16, CA9, GD2, GD3, HMWMAA, CD171, Lewis Y, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, receptor de folato a, CD44v6, CD44v7/8, integrina $\alpha v \beta 6$, 8H9, NCAM, receptores de VEGF, 5T4, AchR fetal, ligandos de NKG2D, CD44v6, antígeno doble y universal.

En determinados aspectos de la divulgación, hay células inmunitarias, tales como linfocitos T, que expresan el CAR.CD138 en el ambiente tumoral, en lugar de forma constitutiva. El microambiente de MM hipóxico se ha demostrado por medición directa de la tensión de oxígeno en sitios afectados (22) e indirectamente por la sobreexpresión de HIF-1 α (el regulador maestro de respuestas inducidas por hipoxia) (23, 24). Se puede modular la expresión de CAR.CD138 en linfocitos T controlando su expresión con elementos de respuesta a hipoxia, de modo que los linfocitos T modificados técnicamente expresen el CAR solamente a nivel funcional en el microambiente de MM hipóxico, limitando de este modo la dirección del antígeno en otros órganos.

En algunas realizaciones de la divulgación, hay un vector de expresión que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico de CD138 y uno o más elementos reguladores sensibles a hipoxia funcionalmente relacionados con el mismo. En realizaciones específicas, el vector comprende además una secuencia que codifica un gen suicida inducible.

En una realización, hay un vector de expresión que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico de CD138 y que comprende lo siguiente: a) uno o más elementos reguladores sensibles a hipoxia que están funcionalmente relacionados con el CAR específico de CD138; y/o b) un gen suicida inducible (caspasa 9, virus del herpes simple, timidina quinasa (VHS-tk), citosina desaminasa (CD) y citocromo P450 son ejemplos). En realizaciones específicas, el vector es un vector no vírico o un vector vírico (tal como un vector retrovírico, vector lentivírico, vector adenovírico o vector vírico adenoasociado). En realizaciones específicas, el CAR específico de CD138 comprende una región bisagra de IgG 1. En al menos algunos casos, el CAR específico de CD138 comprende un dominio de señalización intracelular seleccionado del grupo que consiste en CD28, OX40, 4-1BB,

ICOS y una combinación de los mismos.

Los elementos reguladores sensibles a hipoxia pueden comprender un elemento regulador sensible a hipoxia de VEGF, un elemento regulador sensible a hipoxia del receptor α 1B-adrenérgico, elemento regulador sensible a hipoxia de ácido graso sintasa, o una combinación de los mismos.

En realizaciones de la divulgación, hay una célula que comprende un vector de la divulgación. La célula puede ser una célula eucariota, incluyendo una célula humana. Las células pueden ser autólogas, singénicas, alogénicas o xenogénicas en relación con un individuo particular. En algunos casos, los individuos a los que se proporcionan métodos y/o composiciones de la divulgación necesitan tratamiento de cáncer, incluyendo para un tipo de cáncer particular. En algunos casos, el individuo necesita tratamiento para neoplasias malignas hematológicas de linaje B. En casos particulares, el individuo necesita tratamiento para cánceres que expresan CD138, incluyendo al menos mieloma múltiple. La célula puede ser de cualquier tipo, pero en realizaciones específicas la célula es una célula inmunitaria, tal como un linfocito T. La célula pueden ser un linfocito T citotóxico (CTL), linfocito citolítico natural o linfocito T citolítico natural, por ejemplo. La célula puede ser una célula efectora. La célula puede ser un linfocito T que es específico de virus y el virus puede ser VEB, CMV, adenovirus, virus BK, VHH6, VRS, gripal, paragripal, bocavirus, coronavirus, LCMV, de paperas, de sarampión, metaneumovirus, parvovirus B, rotavirus, virus del Nilo Occidental, JC, VHH7 o VIH, por ejemplo.

En algunos casos, la célula comprende al menos otro CAR específico para un antígeno distinto de CD138 o como alternativa a CD138. En realizaciones específicas de la divulgación, el CAR es específico para un antígeno seleccionado del grupo que consiste en antígeno asociado a melanoma (MAGE), antígeno de melanoma expresado de forma preferente (PRAME), survivina, CD19, CD20, CD22, cadena ligera k, CD30, CD33, CD123, CD38, ROR1, ErbB2, ErbB3/4, dímeros de ErbB, EGFr viii, antígeno carcinoembrionario, EGP2, EGP40, mesotelina, TAG72, PSMA, ligandos de NKG2D, B7-H6, receptor de IL-13 a2, MUC1, MUC16, CA9, GD2, GD3, HMW-MAA, CD171, Lewis Y, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, receptor de folato a, CD44v6, CD44v7/8, integrina α v β 6, 8H9, NCAM, receptores de VEGF, 5T4, AchR fetal, ligandos de NKG2D, CD44v6, antígeno doble y universal.

En realizaciones que están además de o como alternativa al uso de CAR específicos de CD138, una célula de la divulgación expresa una proteína de interacción secretable dirigida a CD138, comprendiendo dicha proteína un dominio de activación y un dominio de reconocimiento de antígenos. El dominio de activación, dominio de reconocimiento de antígenos o ambos dominios pueden comprender restos de anticuerpo variables de fragmentos monocatenarios (scFV) y el dominio de activación puede comprender un scFV que reconoce una molécula seleccionada del grupo que consiste en CD3, CD16, CD28, CD40, CD134 y CD 137. En realizaciones particulares, en combinación con un CAR puede haber una molécula de interacción que codifique un motivo de unión a CD138 combinado con un motivo de unión o inhibición de PD-1, CTLA-4, LAG-3, Tim-3, etc. En determinadas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígenos se une con CD138, aunque puede unirse con antígeno asociado a melanoma (MAGE), antígeno de melanoma expresado de forma preferente (PRAME), survivina, CD19, CD20, CD22, cadena ligera k, CD30, CD33, CD123, CD38, ROR1, ErbB2, ErbB3/4, dímeros de ErbB, EGFr viii, antígeno carcinoembrionario, EGP2, EGP40, mesotelina, TAG72, PSMA, ligandos de NKG2D, B7-H6, receptor de IL-13 a2, MUC1, MUC16, CA9, GD2, GD3, HMW-MAA, CD171, Lewis Y, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, receptor de folato a, CD44v6, CD44v7/8, integrina α v β 6, 8H9, NCAM, receptores de VEGF, 5T4, AchR fetal, ligandos de NKG2D, CD44v6, antígeno doble o antígenos tumorales universales.

En aspectos de la divulgación, hay un método para tratar el cáncer en un individuo, que comprende la etapa de suministrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector de la divulgación. En determinadas realizaciones, hay un método para tratar el cáncer en un individuo, que comprende la etapa de suministrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células de la divulgación.

En realizaciones de la divulgación, hay un vector de expresión que codifica un CAR específico de antígeno tumoral y uno o más elementos reguladores sensibles a hipoxia funcionalmente relacionados con el mismo. El vector puede comprender además una secuencia que codifica un gen suicida inducible. En realizaciones de la divulgación, hay un vector de expresión que codifica un CAR específico de antígeno tumoral y que comprende lo siguiente: a) uno o más elementos reguladores sensibles a hipoxia que están funcionalmente relacionados con el CAR específico de antígeno tumoral; y/o b) un gen suicida inducible. Cualquier vector de la divulgación puede incluir un CAR específico para un antígeno tumoral seleccionado del grupo que consiste en antígeno asociado a melanoma (MAGE), antígeno de melanoma expresado de forma preferente (PRAME), survivina, CD19, CD20, CD22, cadena ligera k, CD30, CD33, CD123, CD38, ROR1, ErbB2, ErbB3/4, dímeros de ErbB, EGFr viii, antígeno carcinoembrionario, EGP2, EGP40, mesotelina, TAG72, PSMA, ligandos de NKG2D, B7-H6, receptor de IL-13 a2, MUC1, MUC16, CA9, GD2, GD3, HMW-MAA, CD171, Lewis Y, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, receptor de folato a, CD44v6, CD44v7/8, integrina α v β 6, 8H9, NCAM, receptores de VEGF, 5T4, AchR fetal, ligandos de NKG2D, CD44v6, antígeno doble y universal. La divulgación abarca métodos de tratamiento del cáncer con estos vectores. La divulgación también abarca células que expresan estos vectores y métodos de uso de las células para tratar el cáncer.

En realizaciones de la divulgación, hay un kit que comprende un vector como se describe en el presente documento y/o células como se describen en el presente documento.

En realizaciones de la invención, hay un polinucleótido que codifica un resto de reconocimiento específico de CD138 y tiene uno o más elementos reguladores sensibles a hipoxia funcionalmente relacionados con el mismo. En una realización específica, el resto de reconocimiento específico de CD138 comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico de CD138, una molécula de interacción específica de CD138, o ambos. En realizaciones específicas, el polinucleótido se define además como un vector de expresión. En determinadas realizaciones, el polinucleótido comprende además una secuencia que codifica un gen suicida inducible. En algunos casos, el vector es un vector no vírico o un vector vírico, incluyendo un vector retrovírico, vector lentivírico, vector adenovírico o vector vírico adenoasociado. En determinadas realizaciones, el CAR específico de CD138 comprende una región bisagra de IgG1. En algunos casos, el CAR específico de CD138 comprende un dominio de señalización intracelular seleccionado del grupo que consiste en CD28, OX40, 4-1BB, ICOS y una combinación de los mismos. En aspectos particulares, el gen suicida se selecciona entre el grupo que consiste en caspasa 9, virus del herpes simple, timidina quinasa (VHS-tk), citosina desaminasa (CD) y citocromo P450. En algunas realizaciones, el elemento regulador sensible a hipoxia comprende un elemento regulador sensible a hipoxia de VEGF, un elemento regulador sensible a hipoxia del receptor α 1B-adrenérgico, elemento regulador sensible a hipoxia de ácido graso sintasa, o una combinación de los mismos.

En una realización, se proporciona una célula que comprende un polinucleótido de la divulgación. En realizaciones específicas, la célula es una célula eucariota, tal como una célula humana, incluyendo una célula inmunitaria. En determinadas realizaciones, la célula se define además como autóloga, singénica, alogénica o xenogénica en relación con un individuo particular. El individuo puede necesitar tratamiento del cáncer, incluyendo al menos para neoplasias malignas hematológicas de linaje B tales como mieloma múltiple. En algunos casos, la célula se define además como un linfocito T citotóxico (CTL), linfocito citolítico natural o linfocito T citolítico natural. La célula puede comprender receptores nativos específicos para proteínas de latencia de virus. Los virus ejemplares incluyen VEB, CMV, adenovirus, virus BK, VHH6, VRS, gripal, paragripal, bocavirus, coronavirus, LCMV, de paperas, de sarampión, metaneumovirus, parvovirus B, rotavirus, virus del Nilo Occidental, JC, VHH7 o VIH. En realizaciones particulares, la célula comprende al menos otro CAR específico para un antígeno distinto de CD138. El CAR puede ser específico para un antígeno seleccionado del grupo que consiste en antígeno asociado a melanoma (MAGE), antígeno de melanoma expresado de forma preferente (PRAME), survivina, CD19, CD20, CD22, cadena ligera k, CD30, CD33, CD123, CD38, ROR1, ErbB2, ErbB3/4, dímeros de ErbB, EGFr VIII, antígeno carcinoembrionario, EGP2, EGP40, mesotelina, TAG72, PSMA, ligandos de NKG2D, B7-H6, receptor de IL-13 α 2, MUC1, MUC16, CA9, GD2, GD3, HMW-MAA, CD171, Lewis Y, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, receptor de folato a, CD44v6, CD44v7/8, integrina α v β 6, 8H9, NCAM, receptores de VEGF, 5T4, AchR fetal, ligandos de NKG2D, CD44v6, antígeno doble y universal. En realizaciones particulares, el resto de reconocimiento específico de CD138 comprende una molécula de interacción específica de CD138 que tiene un dominio de activación y un dominio de reconocimiento de antígeno, en el que ambos dominios comprenden restos de anticuerpos variables de fragmentos monocatenarios (scFV). En algunos casos, el dominio de activación es un scFV que reconoce una molécula seleccionada del grupo que consiste en CD3, CD16, CD28, CD40, CD134 y CD137.

Se desvela un método para tratar el cáncer en un individuo, que comprende la etapa de suministrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido de la divulgación. También se desvela un método para tratar el cáncer en un individuo, que comprende la etapa de suministrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células de la divulgación. En realizaciones particulares, hay un kit que comprende un vector de la divulgación. En realizaciones específicas, hay un kit que comprende una o más células de la divulgación. En algunos aspectos, hay un vector de expresión que codifica un CAR específico de antígeno tumoral y uno o más elementos reguladores sensibles a hipoxia funcionalmente relacionados con el mismo. En determinadas realizaciones, el vector comprende además una secuencia que codifica un gen suicida inducible. El vector puede comprender un antígeno tumoral seleccionado del grupo que consiste en antígeno asociado a melanoma (MAGE), antígeno de melanoma expresado de forma preferente (PRAME), survivina, CD19, CD20, CD22, cadena ligera k, CD30, CD33, CD123, CD38, ROR1, ErbB2, ErbB3/4, dímeros de ErbB, EGFr VIII, antígeno carcinoembrionario, EGP2, EGP40, mesotelina, TAG72, PSMA, ligandos de NKG2D, B7-H6, receptor de IL-13 α 2, MUC1, MUC16, CA9, GD2, GD3, HMW-MAA, CD171, Lewis Y, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, receptor de folato a, CD44v6, CD44v7/8, integrina α v β 6, 8H9, NCAM, receptores de VEGF, 5T4, AchR fetal, ligandos de NKG2D, CD44v6, antígeno doble y/o universal.

En lo anterior se ha perfilado de forma más bien general los elementos y ventajas técnicas de la presente invención para que pueda entenderse mejor la descripción detallada de la invención a continuación. Se describirán en lo sucesivo en el presente documento elementos y ventajas adicionales de la invención que forman el objeto de las reivindicaciones de la invención. Los expertos en la materia deberían apreciar que la concepción y realización específica desvelada puede utilizarse fácilmente como una base para la modificación o el diseño de otras estructuras para llevar a cabo los mismos fines de la presente invención. Los expertos en la materia también deberían observar que dichas construcciones equivalentes no se alejan del alcance de la invención como se expone en las reivindicaciones adjuntas. Los nuevos elementos que se cree que son característicos de la invención, tanto con respecto a su organización como con respecto al método de funcionamiento, junto con objetos y ventajas adicionales

se entenderán mejor a partir de la siguiente descripción cuando se considere en relación con las figuras adjuntas. Debe entenderse de forma expresa, sin embargo, que cada una de las figuras se proporciona para el fin de ilustrar y describir solamente y no se pretende que sean una definición de los límites de la presente invención.

5 Breve descripción de los dibujos

Para un entendimiento más completo de la presente invención, se hace ahora referencia a las siguientes descripciones tomadas junto con el dibujo adjunto, en el que:

10 FIG. 1. Generación y caracterización del CAR.CD138. Panel A. Representación esquemática del CAR.CD138 codificado en un vector retroviral. Panel B. Después de transducción retroviral el CAR se expresa eficazmente en linfocitos T CD4+ y CD8+ activados. El Panel C ilustra la actividad citotóxica evaluada con un ensayo de liberación de 51 Cr convencional de control y linfocitos T CAR.CD138 contra dianas de CD138+ (RPMI y U266),
15 diana de CD138- (Raji) y diana de NK (K562). Los datos representan la media $\pm$ DT de 4 donantes diferentes. Panel D. Se cocultivaron linfocitos T de control y CAR+ con dianas de CD138+ (U266 y RPMI) o dianas de CD138- (Raji) (relación de linfocitos T:células tumorales 5:1). Después de 4 días de cultivo, las células se recogieron y se tiñeron con CD3 y CD138 para evaluar el crecimiento de células tumorales. No fue detectable ninguna célula tumoral cuando se cocultivaron con linfocitos T CAR+. Los datos representan la media $\pm$ DT de 4 donantes diferentes. El Panel E muestra los experimentos de cocultivo usando muestras de MO que contenían CP malignas CD138+ de 2 donantes. Los linfocitos T CAR+ pero no las células de control eliminan CP malignas. El Panel F ilustra el perfil de Th1 de linfocitos T en respuesta a las células diana de CD138+ U266.

25 FIG. 2a y 2b. Los linfocitos T CAR.CD138+ tienen efecto anti MM *in vivo*. Se infundieron linfocitos T de control y CAR.CD138+ i.v. en ratones SCID que portaban células U266 marcadas con FFLuc. No se usó ninguna citocina exógena. El crecimiento tumoral se supervisó usando un sistema de captura de imágenes *in vivo* (sistema de captura de imágenes Xenogen-IVIS). Los paneles izquierdos ilustran que el crecimiento tumoral medido como intensidad de la señal (p/s/cm2/sr) fue significativamente mayor en ratones que recibieron linfocitos T de control frente a CAR.CD138+. El panel derecho ilustra el promedio $\pm$ DT de 5 ratones por grupo en dos experimentos diferentes.

30 FIG. 3. Generación y caracterización del hCAR.CD138. Panel A. Representación esquemática del hCAR.CD138 codificado en un vector retroviral. Panel B. Expresión del CAR.CD138 constitutivo y hCAR.CD138 en linfocitos T en hipoxia durante 48 horas en comparación con normoxia. Panel C. Se cocultivaron linfocitos T de control, CAR.CD138+ constitutivos y hCAR.CD138+ con dianas de CD138+ (U266) en hipoxia (relación de linfocitos T:células tumorales 2:1). Después de 3 días de cultivo, las células se recogieron y se tiñeron con CD3 y CD138 para evaluar el crecimiento de células tumorales. No fueron detectables células tumorales cuando estas células se cocultivaron con linfocitos T que expresaban el CAR.CD138 constitutivo o hCAR.CD138.

40 FIG. 4. CAR.CD138 puede expresarse eficazmente y de forma estable en linfocitos T tanto de donantes sanos como de muestras mieloma múltiple (MM). (A) Vector retroviral que codifica el CAR específico de CD138 que incorpora el endodominio de CD28. (B) Se detectó expresión de CAR.CD138 en linfocitos T tanto CD8+ como CD4+. (C) La eficacia de transducción de CAR.CD138 fue de 74 $\pm$ 9 % en las 7 líneas diferentes generadas de donantes sanos y 82 $\pm$ 5 % en 6 líneas generadas de enfermos de MM. (D) Los linfocitos T tanto de control como transducidos de donantes sanos contenían una proporción equilibrada de linfocitos T CD3+CD8+ (57 $\pm$ 26 % y 54 % $\pm$ 14 %) y linfocitos T CD3+CD4+ (35 % $\pm$ 17 % y 37 % $\pm$ 13 %), mientras que los linfocitos T de enfermos de MM tendían a contener más células CD8+ (80 $\pm$ 10 %). Menos del 2 % de las células fueron CD3-CD56+CD16+. Los linfocitos T transducidos de donantes sanos y enfermos de MM contenían también una proporción de células de memoria y efectoras (CD45RO+: 82 $\pm$ 16 % y 79 $\pm$ 9 %, respectivamente; CD62L+=51 $\pm$ 17 % y 42 % $\pm$ 14 %, respectivamente) compatible con el procedimiento de expansión *ex vivo*.

50 FIG. 5 Los linfocitos T CAR.CD138+ se dirigen a líneas celulares tumorales CD138+. Los linfocitos T de donantes sanos que expresaban CAR.CD138 lisaron líneas celulares derivadas de MM CD138+ U266, RPMI-8266, OPM-2 y MM.1S a una tasa significativamente mayor (31 $\pm$ 8 %, 30 % $\pm$ 8 %, 39 % $\pm$ 7 % y 65 $\pm$ 13 % a una relación E:T 10:1, respectivamente) en comparación con linfocitos T de control (9 $\pm$ 2 %, 7 % $\pm$ 6 %, 2 % $\pm$ 6 % y 5 % $\pm$ 2 % a una relación E:T 10:1, respectivamente) en un ensayo de liberación de 51Cr convencional (A, D). Se observó un patrón de destrucción similar cuando se generaron linfocitos T transducidos de enfermos de MM (B). Por el contrario, los linfocitos T CAR.CD138+ tenían actividad insignificante contra dianas de CD138- (Raji, ARH-77 y K562) (A,B,D). También se observó destrucción insignificante con linfocitos T de control (C). (D) Ilustra el sumario $\pm$ DT de al menos 5 experimentos independientes.

60 FIG. 6. Los linfocitos T CAR.CD138+ eliminan células tumorales CD138+ en experimentos de cocultivo. (A) Para evaluar la capacidad a largo plazo de CAR.CD138+ para eliminar células tumorales CD138+, se cocultivaron linfocitos T CAR+ o de control con células tumorales CD138+ (U266, RPMI-8266, OPM-2 y MM.1S) o CD138- (Raji o ARH77) en ausencia de citocinas exógenas y se enumeraron las células tumorales en ausencia de citocinas exógenas después de 5-7 días por análisis de FACS. En presencia de linfocitos T CAR+ hubo eliminación completa de tumores CD138+, mientras que las células tumorales crecieron excesivamente en
65

cultivos con linfocitos T de control (U266: 57 % $\pm$ 18 %; RPMI: 29 % $\pm$ 13 %; OPM-2: 63 % $\pm$ 13 %; MM.1S: 67 % $\pm$ 1 %). Por el contrario, se observó falta de efectos antitumorales contra células diana CD138⁻. (B) Ilustra el sumario $\pm$ DT de 5 experimentos independientes.

FIG. 7. Los linfocitos T CAR.CD138⁺ muestran un perfil de Th1 en respuesta a células tumorales. Para evaluar el perfil de citocinas de linfocitos T CAR.CD138⁺, CAR⁺ o de control se cocultivaron con células tumorales CD138⁺ (U266, RPMI-8266, OPM-2 y MM.1S) o CD138⁻ (Raji). Se recogió el sobrenadante de cultivo después de 24 horas y se analizó con respecto a la presencia de Th1 y citocinas de Th1.

FIG. 8. Los linfocitos T CAR.CD138⁺ se dirigen a células madre cancerosas potenciales. Para asegurar que el enfoque también se dirigiera a células madre cancerosas potenciales, se estudió la expresión de CD138 por células SP contenidas en las células tumorales RPMI-8266 y después se supervisó si este subconjunto también podía eliminarse eficazmente mediante linfocitos T CAR⁺. En cocultivos con linfocitos T de control, no solamente estaban aún presentes células RPMI-8266 (73 % $\pm$ 7 %), sino que también estaba presente aún un promedio de 6 % (intervalo de 0,11 % a 26,7 %) de células SP (A, B). Por el contrario, en cultivos con linfocitos T CAR⁺, las células RPMI se redujeron significativamente (11 % $\pm$ 10 %) y no fueron detectables células SP (0,04 % $\pm$ 0,07 %) (A,B). Para confirmar adicionalmente esta capacidad, las células SP se clasificaron directamente de la línea celular RPMI y se cultivaron con linfocitos T de control o CAR⁺ (C). Las células clasificadas como células SP se eliminaron completamente solamente en presencia de linfocitos T transducidos. Se muestran dos experimentos de cocultivo representativos.

FIG. 9. Los linfocitos T CAR.CD138⁺ se dirigen a células de mieloma primario. (A) Los linfocitos T CAR⁺ generados de donantes sanos eliminaron con éxito células tumorales seleccionadas CD138 de enfermos de MM a diferencia de linfocitos T de control (<80 % de factor de reducción). (B) Los linfocitos T CAR⁺ autólogos de forma similar eliminaron células de MM primarias (37 % $\pm$ 14 %) en comparación con linfocitos T de control (2 % $\pm$ 2 %) (factor de reducción de 90 % $\pm$ 10 %). (C) El perfil de citocinas en estos experimentos era coherente con Th1.

FIG. 10. Los linfocitos T CAR.CD138⁺ tienen actividad antitumoral *in vivo*. Ratones NSG recibieron administración intravenosa de 4x10⁶ células OPM-2 marcadas con luciferasa de luciérnaga, seguido de 3 infusiones i.v. con infusiones de linfocitos T CAR.CD138⁺ (1x10⁷). Se realizó captura de imágenes bioluminiscente (IBL) comenzando el día 23 para supervisar el crecimiento tumoral. (A) Fotones promedio/s/cm²/sr por ratón, determinado mediante BLI, en comparación con ratones tratados con linfocitos T de control (NT, n=11, círculos negros) o linfocitos T CAR.CD138⁺ (n=11, cuadrados grises). Media $\pm$ ETM, *p=0,05 el día 59. Sumario de 3 experimentos independientes. (D) Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones tratados con linfocitos T CAR.CD138⁺ o linfocitos T de control (p<0,01).

FIG. 11. Generación y función de CAR.CD 138 (HRE.CAR.CD138) inducible por hipoxia. (A) Representación esquemática del HRE.CAR.CD138 codificado en un vector retroviral. (B) Se cocultivaron linfocitos T de control, CAR.CD138⁺ constitutivos o HRE.CAR.CD138⁺ con las dianas de CD138⁺ (U266) en normoxia (tensión de O₂ 20 %) o hipoxia (tensión de O₂ 1 %). Después de 4 días de cultivo, las células se recogieron y se tiñeron con CD3 y CD138 para evaluar el crecimiento de células tumorales. También se evaluó la expresión de CAR en linfocitos T. Los linfocitos T HRE.CAR.CD138⁺ eliminaron las células tumorales en condiciones hipóxicas. (C) Se marcaron linfocitos T de control, CAR.CD138⁺ constitutivos o HRE.CAR.CD138⁺ con CFSE y se cocultivaron con las dianas de CD138⁺ (U266) en normoxia (tensión de O₂ 20 %) o hipoxia (tensión de O₂ 1 %). Después de 4 días de cultivo, las células se recogieron, se tiñeron con CD3 y se midió la dilución de CFSE mediante citometría de flujo. Los linfocitos T HRE.CAR.CD138⁺ proliferaron en condiciones hipóxicas.

Descripción detallada

Conforme a la convención de ley de patentes de larga duración, las palabras "un" y "una" cuando se usan en la presente memoria descriptiva en concierto con la expresión que comprende, incluyendo las reivindicaciones, indican "uno o más". Algunas realizaciones de la divulgación pueden consistir o consistir esencialmente en uno o más elementos, etapas del método y/o métodos de la divulgación. Se contempla que cualquier método o composición descrito en el presente documento puede implementarse con respecto a cualquier otro método o composición descrito en el presente documento.

Los términos "hipóxico" como se usa en el presente documento se refiere a tensión de O₂ 20 % e "hipoxia" como se usa en el presente documento se refiere a tensión de O₂ 1 %. En realizaciones específicas, la hipoxia tisular fisiológica se considera <~7,98 kPa.

I. Realizaciones generales

En realizaciones de la divulgación, hay métodos y composiciones para tratar células cancerosas que expresan CD138. En realizaciones específicas, el cáncer es neoplasias malignas hematológicas, tales como mieloma múltiple (MM) o tumores sólidos, tales como cáncer de mama, y tumores sólidos que son casi invariablemente hipóxicos. Los métodos y composiciones están relacionados con la aportación de tratamiento que suministre terapia a

determinados tejidos o células que lo necesiten pero que evita el suministro a células no cancerosas que expresan CD138. Los métodos y composiciones están relacionados con la aportación de tratamiento que suministre terapia a tejidos o células cancerosas que expresan CD138 pero que evita el suministro a células que expresan CD138 pero que no necesitan terapia de cáncer. En realizaciones particulares la terapia es eficaz en tejidos o ambientes que son hipóxicos y la terapia es ineficaz en tejidos o ambientes que son normóxicos. En aspectos de la divulgación, la terapia es eficaz en tejidos o ambientes que son hipóxicos y no es eficaz en tejidos o ambientes normóxicos debido a que no está presente un resto terapéutico en tejidos o ambientes normóxicos. En algunos casos, la terapia celular puede ser eficaz en tejidos o ambientes que son hipóxicos y no es eficaz en tejidos o ambientes normóxicos debido a que las células carecen de expresión de un resto terapéutico en tejidos o ambientes normóxicos pero que está presente en tejidos o ambientes hipóxicos. El resto terapéutico comprende al menos CAR específico de antígeno CD138, en realizaciones de la divulgación. Otros antígenos específicos de tejido pueden ser diana teniendo también restos correspondientes expresión específica de tejido o específica de ambiente.

Aspectos particulares de la divulgación proporcionan terapia para MM para un individuo que se sabe que tiene MM, se sospecha que tiene MM o está en riesgo de desarrollar MM. Puede determinarse que el individuo tiene MM por un medio distinto de la identificación de células cancerosas CD138 positivas, en algunos casos. En realizaciones particulares la terapia ya se ha proporcionado o se está proporcionando al individuo. El individuo puede ser refractario para una o más terapias de MM (distintas de la divulgación) de cualquier tipo inicialmente o después de algún periodo de tiempo en la terapia.

Aspectos particulares de la divulgación proporcionan terapia para cáncer de mama para un individuo que se sabe que lo tiene, se sospecha que lo tiene o está en riesgo de desarrollarlo (tal como tener uno o más marcadores genéticos indicativos o un historial familiar o personal). Puede determinarse que el individuo tiene cáncer de mama por un medio distinto de la identificación de células cancerosas CD138 positivas, en algunos casos. En realizaciones particulares la terapia de cáncer de mama ya se ha proporcionado o se está proporcionando al individuo. El individuo puede ser refractario para una o más terapias de cáncer de mama (distintas de la divulgación) de cualquier tipo inicialmente o después de algún periodo de tiempo en la terapia.

A pesar de mejoras significativas en las opciones terapéuticas para MM, la enfermedad sigue siendo esencialmente incurable. En particular, los inventores y otros han mostrado que linfocitos T que expresan receptores de antígenos quiméricos (CAR) dirigidos a antígenos asociados a tumor (AAT) y que incorporan endodominios coestimulantes adecuados son un medio atractivo para tratar neoplasias malignas hematológicas del linaje B. Debido a que las células plasmáticas (CP) malignas expresan altos niveles del antígeno CD138, se razonó que podrían eliminarse eficazmente por linfocitos T redirigidos para dirigirse a este antígeno. De hecho, un CAR específico de CD138 (CAR.CD138) ha mostrado actividad útil contra células tumorales CD138+ en estudios iniciales. Una salvedad para el uso de CD138 es que el antígeno también se expresa a niveles bajos en las superficies basolaterales de células epiteliales, células mesenquimatosas, células de músculo liso vascular, células endoteliales y células neurales, por ejemplo, aumentando el riesgo de toxicidad "en diana" pero "fuera de órgano" o "fuera de tejido" con linfocitos T modificados por CAR. De este modo, en realizaciones específicas de la divulgación se puede aprovechar la naturaleza hipóxica del microambiente de médula ósea (MO) normal y de MM expresando el CAR.CD138 bajo el control inducible de elementos sensibles a hipoxia. Se pueden definir también los elementos inmunitarios más ventajosos para coestimulación de linfocitos T modificados por CAR en un ambiente hipóxico tanto *in vitro* como *in vivo*, tal como en un modelo de ratón xenogénico. Finalmente, para aumentar adicionalmente la seguridad de realizaciones de la divulgación, se puede incorporar en una construcción un gen suicida, tal como un gen suicida previamente validado basado en caspasa inducible 9 (iC9). Esta estrategia permite la anulación rápida de linfocitos T modificados por CAR si números mayores de lo anticipado escapan al ambiente de MO hipóxico y conservaran suficiente expresión de CAR funcional para provocar toxicidad "en diana" pero "fuera de órgano". En determinados aspectos, se puede fabricar el vector retroviral de uso clínico y líneas de linfocitos T autólogos modificados por CAR de enfermos de MM e infundir estas células en pacientes con MM recidivante admitidos en un ensayo clínico de fase I. En determinados casos se puede evaluar la seguridad del procedimiento *in vivo* de los linfocitos T infundidos y la acumulación de estas células en la MO y la expresión diferencial del CAR por linfocitos T en sangre periférica (SP) frente a MO. Si se produce toxicidad, se puede determinar la actividad del gen de seguridad de iC9 *in vivo*. Se puede evaluar también si las infusiones de linfocitos T proporcionan control de enfermedad en pacientes con enfermedad detectable.

Es un objeto de la divulgación aprovechar la naturaleza hipóxica de microambiente de MO de MM expresando el CAR.CD 138 bajo el control inducible de elementos sensibles a hipoxia (HRE). Se pueden definir también los elementos inmunitarios más ventajosos para coestimulación de linfocitos T modificados por CAR en un ambiente hipóxico tanto *in vitro* como *in vivo* en un modelo de ratón xenogénico. Finalmente, para aumentar adicionalmente la seguridad del enfoque propuesto, se puede incorporar en la construcción un gen suicida previamente validado basado en caspasa inducible 9 (iC9). En determinadas realizaciones, la caspasa inducible 9 (iCaspasa9) es dimerizable usando una molécula pequeña, por ejemplo, AP1903. Véase, por ejemplo, Straathof *et al.*, Blood 105:4247-4254 (2005).

Se puede fabricar un vector de uso clínico (tal como un vector retroviral) y líneas de linfocitos T modificadas por CAR de enfermos de MM e infundirlas en pacientes con MM recidivante. Se puede evaluar la seguridad del

procedimiento y, si se produce toxicidad, se puede administrar el fármaco dimerizador para activar el gen de seguridad de iC9 *in vivo*. Se puede evaluar también si las infusiones de linfocitos T proporcionan control de enfermedad en pacientes con enfermedad detectable.

Es un objeto de la divulgación caracterizar el destino de los linfocitos T CAR infundidos midiendo su supervivencia *in vivo* y los efectos posteriores del fármaco dimerizador en estas células *in vitro* y, si se indica clínicamente, *in vivo*. También se puede comparar la acumulación de estas células en la MO y sangre periférica, la expresión diferencial del CAR por linfocitos T en cada ambiente, y su capacidad relacionada para destruir células tumorales. Las células y, cuando sea aplicable, el fármaco dimerizador, pueden proporcionarse clínicamente a un individuo que lo necesite.

Las realizaciones en la presente divulgación inducirán CTL específicos de survivina en enfermos de MM por vacunación. En un enfoque complementario, la divulgación proporciona CP neoplásicas diana, haciendo uso de tecnología de CAR en neoplasias malignas hematológicas.

II. Neoplasias malignas hematológicas

Las neoplasias malignas hematológicas incluyen tipos de cáncer que afectan a la sangre, médula ósea y ganglios linfáticos. Puede derivar de cualquiera de los dos linajes de células sanguíneas principales: líneas celulares mieloides o linfoideas. La línea celular mielóide normalmente produce granulocitos, eritrocitos, trombocitos, macrófagos y mastocitos; la línea celular linfoide produce linfocitos B, T, NK y células plasmáticas. Linfomas, leucemias linfocíticas y mieloma son de la línea linfoide, mientras que la leucemia mielógena aguda y crónica, síndromes mielodisplásicos y enfermedades mieloproliferativas son de origen mielóide. En determinadas realizaciones cualquiera de estas neoplasias malignas hematológicas se pueden tratar con métodos y/o composiciones de la divulgación.

El mieloma múltiple (MM, que también se conoce como mieloma de células plasmáticas o enfermedad de Kahler) puede tratarse con métodos y composiciones de la presente divulgación. El MM es un cáncer de células plasmáticas, que son un tipo de glóbulo blanco normalmente responsable de la producción de anticuerpos. En MM, múltiples células plasmáticas anómalas se acumulan en la médula ósea, donde alteran la producción de células sanguíneas normales. El MM puede diagnosticarse de una diversidad de maneras, tal como con análisis de sangre (electroforesis de proteínas del suero o ensayo de cadena ligera kappa/lambda sin suero, por ejemplo), examen de la médula ósea, electroforesis de proteínas de la orina y rayos X de huesos habitualmente implicados. Aunque se considera incurable, puede tratarse con esteroides, quimioterapia, inhibidores de proteasomas (por ejemplo, bortezomib), fármacos inmunomoduladores (IMiD) tales como talidomida o lenalidomida, radiación y/o trasplantes de células madre. Determinados síntomas incluyen, por ejemplo, calcio elevado, insuficiencia renal, anemia y/o lesiones óseas, por ejemplo. El tratamiento de la presente divulgación es útil para el estadio I, estadio II o estadio III de MM. Parte del tratamiento para MM puede incluir ensayo de cadena ligera sin suero, análisis esquelético, biopsia de médula ósea y/o medida cuantitativa de IgG, por ejemplo.

Además de realizaciones de la divulgación, se puede proporcionar a un enfermo de MM quimioterapia de alta dosis con trasplante de células madre hematopoyéticas autólogas, particularmente si el individuo tiene menos de 65 años de edad. Antes del trasplante de células madre, estos individuos pueden recibir un ciclo inicial de quimioterapia de inducción, tal como talidomida, dexametasona, regímenes basados en bortezomib, lenalidomida o combinaciones de los mismos. Puede emplearse trasplante de células madre autólogas o alogénicas (ASCT). Los individuos de más de 65 años de edad pueden tratarse con melfalán, prednisona, bortezomib, melfalán, lenalidomida o una combinación de los mismos.

III. CD138

CD138 (también conocido como sindecano 1) es una proteína que en los seres humanos está codificado por el gen SDC1. Como ilustración, el n.º de referencia de GenBank® BC008765 proporciona un polinucleótido CD138 y el n.º de referencia de GenBank® AAH08765 proporciona un polipéptido CD138 ejemplar, ambos de los cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. Dichas secuencias son útiles para el experto en la materia para generar moléculas de CAR específicas de CD138, por ejemplo.

IV. Receptores de antígenos quiméricos (CAR)

En algunos casos, las células se modifican para expresar un CAR específico de CD138. La modificación por ingeniería genética de linfocitos T humanos para que expresen receptores de antígenos quiméricos (CAR) dirigidos a tumor puede producir células efectoras antitumorales que evitan los mecanismos de escape inmunitario del tumor en procesamiento y presentación de antígenos proteicos. Además, estos receptores transgénicos pueden dirigirse a antígenos asociados a tumores que no son derivados de proteínas. En determinadas realizaciones de la divulgación hay CTL que se modifican para comprender al menos un CAR. En aspectos específicos, una célula particular comprende expresión de dos o más restos de reconocimiento específicos de CD138, incluyendo dos o más CAR específicos de CD138.

La presente divulgación incluye un receptor de linfocitos T artificial denominado CAR (también puede denominarse receptores de linfocitos T quiméricos o inmunorreceptores quiméricos). En realizaciones de la divulgación es específico para CD138. El CAR en general puede incluir un ectodominio, dominio transmembrana y endodominio. Puede ser de primera generación, segunda generación o tercera generación, en realizaciones específicas.

En casos particulares, las células inmunitarias incluyen un CAR que es quimérico, no natural, modificado técnicamente al menos en parte por la mano del hombre y dirigido a CD138. En casos particulares, el CAR modificado técnicamente tiene uno, dos, tres, cuatro o más componentes, y en algunas realizaciones el o los componentes facilitan la dirección o unión del linfocito T a la célula cancerosa que comprende antígeno tumoral. En realizaciones específicas, el CAR comprende un anticuerpo para el antígeno tumoral, parte de o todo el dominio de señalización citoplasmático y/o parte de o todas de una o más moléculas coestimulantes, por ejemplo endodominios de moléculas coestimulantes. En realizaciones específicas, el anticuerpo es un fragmento variable monocatenario (scFv). En determinados aspectos el anticuerpo se dirige a antígenos diana en la superficie celular de células cancerosas que expresan CD138, por ejemplo. En determinadas realizaciones, un dominio de señalización citoplasmático, tal como los derivados de la cadena ζ del receptor de linfocitos T, se emplea como al menos parte del receptor quimérico para producir señales estimulantes para proliferación y función efectora de linfocitos T después de la interacción del receptor quimérico con el antígeno diana. Los ejemplos incluirían, pero sin limitación, endodominios de moléculas coestimulantes tales como CD27, CD28, 4-1BB y OX40 o los componentes de señalización de receptores de citocinas tales como IL7 e IL15. En realizaciones particulares, se emplean moléculas coestimulantes para potenciar la activación, proliferación y citotoxicidad de linfocitos T producidas por el CAR después de la interacción con el antígeno. En realizaciones específicas, las moléculas coestimulantes son CD28, OX40 y 4-1BB y citocina y los receptores de citocinas son IL7 e IL15.

En general, un ectodominio del CAR abarca un péptido señal, dominio de reconocimiento de antígenos y un espaciador que une el dominio de reconocimiento de antígenos con el dominio transmembrana. El dominio de reconocimiento de antígenos comprenderá en general un fragmento variable monocatenario (scFv) específico para CD138. Sin embargo, en casos en los que haya dos o más CAR en la misma célula, el segundo CAR puede comprender un scFv específico para uno cualquiera de antígeno asociado a melanoma (MAGE), antígeno de melanoma expresado de forma preferente (PRAME), survivina, CD19, CD20, CD22, cadena ligera κ , CD30, CD33, CD123, CD38, ROR1, ErbB2, ErbB3/4, EGFR vIII, antígeno carcinoembrionario, EGP2, EGP40, mesotelina, TAG72, PSMA, ligandos de NKG2D, B7-H6, receptor de IL-13 α 2, MUC1, MUC16, CA9, GD2, GD3, HMW-MAA, CD171, Lewis Y, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSC1, receptor de folato α , CD44v6, CD44v7/8, 8H9, NCAM, receptores de VEGF, 5T4, AchR fetal, ligandos de NKG2D o CD44v6, por ejemplo.

Los ejemplos de regiones bisagra para el ectodominio incluyen la región CH2CH3 de inmunoglobulina, la región bisagra de IgG1 y partes de CD3. La región transmembrana puede ser de cualquier tipo, aunque en algunos casos es CD28.

En general, el endodominio del CAR de la divulgación se utiliza para transmisión de señales en la célula después del reconocimiento de antígenos y agrupamiento de los receptores. El componente de endodominio más habitualmente usado es CD3-zeta que contiene 3 ITAM y que transmite una señal de activación al linfocito T después de unirse el antígeno. En algunas realizaciones, se utiliza señalización coestimulante adicional, tal como CD3-zeta en combinación con CD28, 4-1BB y/o OX40.

V. Genes suicidas

En realizaciones de la divulgación, se emplea un gen suicida en vectores de expresión particulares para permitir que la célula se destruya a sí misma mediante apoptosis en un punto temporal o localización o acontecimiento fisiológico deseado, por ejemplo. El gen suicida puede estar presente en el mismo vector de expresión que el vector CD138-CAR. Aunque se conocen en la técnica y se usan habitualmente genes suicidas, en realizaciones específicas el gen suicida usado en la divulgación es caspasa 9, virus del herpes simple, timidina quinasa (VHS-tk), citosina desaminasa (CD) o citocromo P450. En aspectos específicos el gen suicida es inducible y se activa usando un inductor químico de dimerización (CID) específico (Ramos *et al.*, 2010).

VI. Elementos reguladores sensibles a hipoxia

Realizaciones de la divulgación emplean elementos reguladores que permiten el control ambiental de la actividad de las células terapéuticas, incluyendo control de la expresión de receptores de antígenos artificiales en células terapéuticas. En realizaciones específicas, la expresión de un CAR se regula de una manera específica ambiental o de tejido, tal como en presencia de hipoxia o en tejidos hipóxicos. El o los elementos se utilizan en el vector de expresión que codifica un CAR específico de CD138 y está relacionado funcionalmente con la secuencia que codifica el CAR específico de CD138. Funcionalmente relacionado puede significar que el o los elementos se configuran de una manera adecuada para poder modular la expresión de la secuencia que codifica el polipéptido de CAR específico de CD138. Dichos elementos por definición en un ambiente normóxico no son capaces de afectar a la transcripción del CAR específico de CD138 en absoluto o en una cantidad mayor que insignificante, en algunas realizaciones.

Los HRE ejemplares que pueden emplearse incluyen la secuencia NCGTG, por ejemplo, y en realizaciones particulares la secuencia se repite en tándem, tal como al menos 6 veces, aunque puede ser 7, 8, 9, 10 o más veces.

5 VII. Moléculas de interacción

En algunas realizaciones de la divulgación, las células de la divulgación que comprenden un CAR específico de CD138 también se modifican para expresar una molécula de interacción. Dichas células son capaces de secretar una molécula de interacción de linfocitos T biespecíficas, en realizaciones particulares. La biespecificidad en realizaciones particulares abarca la presencia de un dominio de activación y un dominio de reconocimiento de antígenos. El dominio de reconocimiento de antígenos se une con moléculas que están presentes en o sobre células diana o que son secretadas por células diana y el dominio de activación se une a receptores de superficie celular presentes en linfocitos T, linfocitos NK o linfocitos NKT que inducen procesos que en última instancia activan la célula receptora. El dominio de unión y dominio de reconocimiento de antígenos pueden ser de cualquier tipo, pero en realizaciones específicas un scFv es específico para una molécula de superficie celular que media en la activación y el otro scFv es específico para un antígeno tumoral particular elegido, incluyendo CD138 u otro antígeno tumoral. El scFv particular para el antígeno tumoral puede adaptarse para reconocer una célula cancerosa correspondiente que tiene el antígeno tumoral particular.

En aspectos particulares, la molécula de interacción comprende un dominio de activación que se une con una molécula de activación en una superficie de células inmunitarias (o una superficie de células inmunitarias modificada técnicamente) y un dominio de reconocimiento de antígenos que se une con un antígeno de célula diana, por ejemplo, un antígeno expresado sobre la superficie de una célula tumoral o célula cancerosa.

La molécula de interacción puede ser bipartita (por ejemplo, que comprende un dominio de activación y dominio de reconocimiento de antígenos que pueden unirse opcionalmente por un enlazador) o puede ser tripartita o multipartita (por ejemplo, comprende uno o más dominios de activación y/o dominios de reconocimiento de antígenos, u otros dominios). En realizaciones específicas, el dominio de activación de la molécula de interacción es o comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno o parte del mismo, por ejemplo, un fragmento variable monocatenario (scFv). En otras realizaciones específicas, el dominio de reconocimiento de antígenos es o comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno o parte del mismo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o un scFv, o puede comprender ligandos, péptidos, receptores de linfocitos T solubles o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, el dominio de activación y dominio de reconocimiento de antígenos se unen por un enlazador, por ejemplo, un enlazador peptídico.

El experto en la materia reconoce que células inmunitarias tienen diferentes receptores activadores y la molécula de interacción se adaptará a la célula que se active. Por ejemplo, CD3 es un receptor activador en linfocitos T, mientras que CD16, NKG2D o NKp30 son receptores activadores en linfocitos NK y CD3 o un TCR invariante son los receptores activadores en linfocitos NKT. Las moléculas de interacción que activan linfocitos T pueden tener por lo tanto un dominio de activación diferente que moléculas de interacción que activan linfocitos NK. En realizaciones específicas, por ejemplo, en las que la célula inmunitaria es un linfocito T, la molécula de activación es uno o más de CD3, por ejemplo, CD3γ, CD3δ o CD3ε; o CD27, CD28, CD40, CD134, CD137 y CD278. En otras realizaciones específicas, por ejemplo, en la que la célula inmunitaria es un linfocito NK, la molécula de activación es CD16, NKG2D o NKp30, o en la que la célula inmunitaria es un linfocito NKT, la molécula de activación es CD3 o un TCR invariante.

En otras realizaciones determinadas, la molécula de interacción comprende adicionalmente uno o más dominios accesorios, por ejemplo, uno o más de una citocina, un dominio coestimulante, un dominio que inhibe moléculas reguladoras negativas de activación de linfocitos T, o una combinación de los mismos. En realizaciones específicas, la citocina es IL-15, IL-2 y/o IL-7. En otras realizaciones específicas, el dominio coestimulante es CD27, CD80, CD86, CD134 o CD137. En otras realizaciones específicas, el dominio que inhibe moléculas reguladoras negativas de activación de linfocitos T es PD-1, PD-L1, CTLA4 o B7-H4.

En algunos casos, un scFv de la molécula de interacción es específico para EphA2, CD 19, 8H9, CAIX, CD20, CD30, CD33, CD44, CD70, CD123, CD138, EGFR, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EpCAM, EphA2, ERBB2 (HER2), ERBB3, ERBB4, FAP, FAR, FBP, GD2, GD3, HLA-A1+MAGE1, IL11Rα, IL13Ra2, cadena ligera k, KDR, Lambda, Lewis-Y, MCSP, mesotelina, Muc1, NCAM, ligandos de NKG2D, TAG72, TEM1, TEM8, CEA, PSCA y PSMA.

VIII. Especificidad de virus

En realizaciones de la divulgación, las células CD138-CAR son CTL cuyos receptores nativos son específicos para proteínas de latencia de virus, tales como las derivadas de VEB, VIH, HTLV-1, etc. Estos CTL específicos de virus pueden recibir coestimulación fisiológica de células presentadoras de antígenos profesionales que procesan antígenos víricos latentes y destruir células tumorales mediante su CAR. Esta especificidad doble permite que CTL redirigidos reciban coestimulación fisiológica de células presentadoras de antígenos profesionales, aprovechando al mismo tiempo actividad antitumoral mediante el CAR.

Un experto en la materia reconoce que es rutinario generar dichos tipos de células.

IX. Células hospedadoras que comprenden un CAR específico de CD138

- 5 Las realizaciones de células de la divulgación incluyen las que son capaces de expresar un CAR específico de CD138 e incluyen linfocitos T, linfocitos NK y linfocitos NKT, por ejemplo. Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular", y "cultivo celular" pueden usarse indistintamente. Todas estas expresiones incluyen también su descendencia, que es todas y cada una de las generaciones posteriores. Se entiende que toda la descendencia puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. En el contexto de la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga, una "célula hospedadora" puede referirse a una célula procariota o eucariota, e incluye cualquier organismo transformable que sea capaz de replicar un vector y/o expresar un gen heterólogo codificado por un vector. Una célula hospedadora puede usarse, y se ha usado, como un receptor para vectores. Una célula hospedadora puede "transfectarse" o "transformarse", lo que se refiere a un proceso por el que ácido nucleico exógeno se transfiere o introduce en la célula hospedadora. Una célula transformada incluye la célula objeto primaria y su descendencia. Como se usa en el presente documento, se pretende que las expresiones células o células hospedadoras "modificadas técnicamente" o "recombinantes" se refieran a una célula en la que se ha introducido una secuencia de ácido nucleico exógena, tal como, por ejemplo, un vector. Por lo tanto, las células recombinantes son distinguibles de células de origen natural que no contienen un ácido nucleico introducido de forma recombinante. En realizaciones de la divulgación, una célula hospedadora es una célula inmunitaria, tal como un linfocito T, incluyendo un linfocito T citotóxico (también conocido como TC, linfocito citotóxico T, CTL, linfocito citocida T, linfocito T citolítico, linfocitos T CD8+ o linfocito T citocida); linfocitos NK, linfocitos NKT y otras células inmunitarias que pueden inducir una función efectora también están abarcadas en la divulgación.

- 25 En determinadas realizaciones, se contempla que ARN o secuencias proteicas pueden coexpresarse con otros ARN seleccionados o secuencias proteicas en la misma célula hospedadora. Puede conseguirse coexpresión cotransfectando la célula hospedadora con dos o más vectores recombinantes distintos. Como alternativa, puede construirse un único vector recombinante para que incluya múltiples regiones codificantes distintas de ARN, que después podrían expresarse en células hospedadoras transfectadas con el vector individual.

- 30 Algunos vectores pueden emplear secuencias de control que permiten que se replique y/o exprese en células tanto procariotas como eucariotas. Un experto en la materia entendería además las condiciones en las que incubar todas las células hospedadoras anteriores para mantenerlas y permitir la replicación de un vector. También se entienden y conocen técnicas y condiciones que permitirían producción a gran escala de vectores, así como producción de los ácidos nucleicos codificados por vectores y sus polipéptidos, proteínas o péptidos afines.

- 35 Las células usadas en la divulgación son eucariotas, incluyendo de mamífero, aunque pueden emplearse células procariotas para manipulación en la ingeniería recombinante de vectores o ADN para integrar en los vectores. Las células son particularmente humanas, pero pueden asociarse con cualquier mamífero de interés, particularmente animales domesticados, tales como équidos, bóvidos, mórvidos, óvidos, cánidos, félidos, etc. para su uso en su animal respectivo. Entre estas especies, pueden estar implicados diversos tipos de células, tales como linfocitos T, linfocitos NK, linfocitos NKT, etc.

- 45 Las células pueden ser células autólogas, células singénicas, células alogénicas e incluso en algunos casos, células xenogénicas, tal como en relación con el individuo que recibe las células. Las células pueden modificarse cambiando el perfil del complejo mayor de histocompatibilidad ("MHC"), inactivando microglobulina β_2 para evitar la formación de moléculas del MHC de clase I, inactivación de moléculas de clase II, posibilitando la expresión de una o más moléculas del MHC, potenciando o inactivando capacidades citotóxicas mediante la potenciación o inactivación de la expresión de genes asociados con la actividad citotóxica, o similares.

- 50 En algunos casos pueden ser de interés clones específicos o células oligoclonales, donde las células tienen una especificidad particular, tales como linfocitos T y linfocitos B que tienen una especificidad antigénica específica o especificidad de sitio diana dirigido.

- 55 Las células de la divulgación que tienen un CAR específico de CD138 también pueden expresar un segundo CAR, también pueden expresar una molécula de interacción y/o pueden ser específicas víricas, y cualquier construcción de expresión recombinante puede estar o no bajo la regulación de HRE.

- 60 Pueden introducirse vectores de expresión que codifican el CAR específico de CD138 en las células como una o más moléculas o construcciones de ADN, en las que puede haber al menos un marcador que permitirá la selección de células hospedadoras que contienen la construcción o las construcciones. Las construcciones pueden prepararse de maneras convencionales, en las que los genes y regiones reguladoras pueden aislarse, según sea apropiado, ligarse, clonarse en un hospedador de clonación apropiado, analizarse por restricción o secuenciación, u otros medios convenientes. En particular, usando PCR, pueden aislarse fragmentos individuales que incluyen toda o partes de una unidad funcional, en los que pueden introducirse una o más mutaciones usando "reparación de cebadores", ligamiento, mutagénesis *in vitro*, etc., según sea apropiado. La construcción o las construcciones una vez completadas y que se ha demostrado que tienen las secuencias apropiadas pueden después introducirse en el

CTL por cualquier medio conveniente. Las construcciones pueden integrarse y empaquetarse en genomas víricos defectuosos, no replicativos, como adenovirus, virus adenoasociado (VAA) o virus del herpes simple (VHS) u otros, incluyendo vectores retrovíricos, para infección o transducción en células. Las construcciones pueden incluir secuencias víricas para transfección, si se desea. Como alternativa, la construcción puede introducirse por fusión, electroporación, biolística, transfección, lipofección o similares. Las células hospedadoras pueden cultivarse y expandirse en cultivo antes de la introducción de la construcción o las construcciones, seguido del tratamiento apropiado para la introducción de la construcción o las construcciones y la integración de la construcción o las construcciones. Después las células se expanden y se exploran en virtud de un marcador presente en la construcción. Diversos marcadores que pueden usarse incluyen con éxito hprt, resistencia a neomicina, timidina quinasa, resistencia a higromicina, etc.

En muchas situaciones se puede desear poder destruir las células modificadas, cuando uno desee terminar el tratamiento, las células se hacen neoplásicas, en investigación en la que la ausencia de las células después de su presencia sea de interés, u otro acontecimiento. Para este fin se puede posibilitar la expresión de determinados productos génicos en los que se pueden destruir las células modificadas en condiciones controladas. Los productos de genes suicidas, tales como caspasa 9, son ejemplos de dichos productos.

Como ilustración, los enfermos de cáncer o pacientes susceptibles al cáncer o que se sospecha que tienen cáncer pueden tratarse de la siguiente manera. Pueden administrarse células modificadas como se describen en el presente documento al paciente y conservarse durante periodos de tiempo prolongados. El individuo puede recibir una o más administraciones de las células. Las células ilustrativas incluyen linfocitos T de CAR específico de CD138 sensible a hipoxia. La célula o las células se modificarían al menos para expresar al menos CAR específico de CD138 sensible a hipoxia y se proporcionan al individuo que lo necesite.

X. Introducción de construcciones en células

Las construcciones de CAR específico de CD138 sensible a hipoxia, o cualquier construcción descrita en el presente documento, puede introducirse como una o más moléculas o construcciones de ADN, en las que puede haber al menos un marcador que permitirá la selección de células hospedadoras que contienen la construcción o las construcciones. Las construcciones pueden prepararse de maneras convencionales, en las que los genes y regiones reguladoras pueden aislarse, según sea apropiado, ligarse, clonarse en un hospedador de clonación apropiado, analizarse por restricción o secuenciación, u otros medios convenientes. En particular, usando PCR, pueden aislarse fragmentos individuales que incluyen toda o partes de una unidad funcional, en los que pueden introducirse una o más mutaciones usando "reparación de cebadores", ligamiento, mutagénesis *in vitro*, etc., según sea apropiado. La construcción o las construcciones una vez completadas y que se ha demostrado que tienen las secuencias apropiadas pueden después introducirse en la célula hospedadora por cualquier medio conveniente. Las construcciones pueden integrarse y empaquetarse en genomas víricos defectuosos, no replicativos, como adenovirus, virus adenoasociado (VAA) o virus del herpes simple (VHS) u otros, incluyendo vectores retrovíricos, para infección o transducción en células. Las construcciones pueden incluir secuencias víricas para transfección, si se desea. Como alternativa, la construcción puede introducirse por fusión, electroporación, biolística, transfección, lipofección o similares. Las células hospedadoras pueden cultivarse y expandirse en cultivo antes de la introducción de la construcción o las construcciones, seguido del tratamiento apropiado para la introducción de la construcción o las construcciones y la integración de la construcción o las construcciones. Después las células se expanden y se exploran en virtud de un marcador presente en la construcción. Diversos marcadores que pueden usarse incluyen con éxito hprt, resistencia a neomicina, timidina quinasa, resistencia a higromicina, etc.

En algunos casos, se puede tener un sitio diana para recombinación homóloga, en el que se desea integrar una construcción en un locus particular. Por ejemplo,) puede inactivar un gen endógeno y reemplazarlo (en el mismo locus o en otra parte) con el gen codificado por la construcción usando materiales y métodos como se conocen en la técnica para recombinación homóloga. Para recombinación homóloga, se puede usar OMEGA o vectores O. Véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, *Cell* (1987) 51, 503-512; Mansour, *et al.*, *Nature* (1988) 336, 348-352; y Joyner, *et al.*, *Nature* (1989) 338, 153-156.

Se conocen bien en la técnica vectores que contienen elementos útiles tales como orígenes de replicación bacterianos o de levadura, marcadores seleccionables y/o amplificables, elementos promotores/potenciadores para expresión en procariotas o eucariotas, etc. que pueden usarse para preparar reservas de ADN de construcción y para llevar a cabo transfecciones, y muchos están disponibles en el mercado.

XI. Administración de células

La divulgación abarca la administración de células a un individuo que lo necesite una vez que las células se han preparado de forma apropiada, incluyendo modificar técnicamente las células para expresar el CAR específico de CD138 y, al menos en algunos casos, expandir las células antes de la administración al individuo.

Las células que se han modificado con las construcciones de ADN se han dejado crecer en cultivo en condiciones selectivas y las células que se seleccionan por tener la construcción pueden después expandirse y analizarse

adicionalmente, utilizando, por ejemplo; la reacción en cadena de la polimerasa para determinar la presencia de la construcción en las células hospedadoras. Una vez que las células hospedadoras modificadas se han identificado o confirmado, estas pueden usarse como se había planeado, por ejemplo expandirse en cultivo o introducirse en un organismo hospedador.

5 Dependiendo de la naturaleza de las células, las células pueden introducirse en un organismo hospedador, por ejemplo un mamífero, en una amplia diversidad de maneras. Las células se introducen localmente, tal como en la médula ósea, en realizaciones específicas, aunque en realizaciones alternativas las células se proporcionan de forma sistémica y se dirigen al cáncer o se modifican para dirigirse al cáncer. El número de células que se emplean
10 dependerá de varias circunstancias, el fin de la introducción, el tiempo de vida de las células, el protocolo que se va a emplear, por ejemplo, el número de administraciones, la capacidad de las células para multiplicarse, la estabilidad de la construcción recombinante y similares. Las células pueden aplicarse como una dispersión, inyectándose en general en o cerca del sitio de interés. Las células pueden estar en un medio fisiológicamente aceptable.

15 No es necesario que la introducción de ADN dé como resultado la integración en todos los casos. En algunas situaciones, el mantenimiento transitorio del ADN introducido puede ser suficiente. De este modo, se podría tener un efecto a corto plazo, en el que las células podrían introducirse en el hospedador y después activarse después de un tiempo predeterminado, por ejemplo, después de que las células hayan sido capaces de dirigirse a un sitio particular.

20 Las células pueden administrarse según se desee. Dependiendo de la respuesta deseada, la forma de administración, la vida de las células, el número de células presentes, pueden emplearse diversos protocolos. El número de administraciones dependerá de los factores descritos anteriormente al menos en parte.

25 Debería apreciarse que el sistema está sujeto a muchas variables, tales como la respuesta celular al ligando, la eficacia de expresión y, según sea apropiado, el nivel de secreción, la actividad del producto de expresión, la necesidad particular del paciente, que puede variar según el tiempo y las circunstancias, la tasa de pérdida de la actividad celular como resultado de la pérdida de células o actividad de expresión en células individuales, y similares. Por lo tanto, se espera que para cada paciente individual, incluso si hubiera células universales que pudieran administrarse a la población en general, cada paciente se supervisaría con respecto a la dosificación
30 apropiada para el individuo, y dichas prácticas de supervisión de un paciente son rutinarias en la técnica.

Se administran linfocitos T modificados por CAR mediante infusión intravenosa. Las dosis pueden variar de $1 \times 10^7/m^2$ a $2 \times 10^8/m^2$, por ejemplo.

35 En casos particulares, se suministran una pluralidad de células inmunitarias que expresan CAR de CD138 a un individuo con cáncer que expresa el antígeno CD138. En realizaciones específicas, se requiere una única administración. En otras realizaciones, se requiere una pluralidad de administración de células. Por ejemplo, después de una primera administración de las células inmunitarias modificadas técnicamente, puede haber un examen del individuo con respecto a la presencia o ausencia del cáncer o para una reducción en el número y/o
40 tamaño de los tumores, por ejemplo. En el caso de que el cáncer muestre una necesidad de tratamiento adicional, tal como tras crecimiento tumoral después de la primera administración, se proporcionan al individuo uno o más suministros de las mismas células que expresan CAR de CD138 (u, opcionalmente, otro tipo de terapia de cáncer, incluyendo otro tipo de inmunoterapia y/o quimioterapia, cirugía y/o radiación). En algunos casos, una reducción del tamaño tumoral en un individuo indica que la inmunoterapia que expresa CAR de CD138 es eficaz, de modo que se
45 proporcionan administraciones adicionales al individuo.

XI. Polinucleótidos que codifican CAR específicos de CD138

50 La presente divulgación también abarca una composición que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR específico de CD138 como se define en el presente documento y células que albergan la secuencia de ácido nucleico. La molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico recombinante, en aspectos particulares y puede ser sintética. Puede comprender ADN, ARN así como PNA (ácido nucleico peptídico) y puede ser un híbrido de los mismos.

55 Además, se prevé para fines adicionales que las moléculas de ácido nucleico pueden contener, por ejemplo, enlaces tioésteres y/o análogos de nucleótidos. Las modificaciones pueden ser útiles para la estabilización de la molécula de ácido nucleico contra endo y/o exonucleasas en la célula. Las moléculas de ácido nucleico pueden transcribirse por un vector apropiado que comprende un gen quimérico que posibilita la transcripción de dicha molécula de ácido nucleico en la célula. A este respecto, también debe entenderse que dichos polinucleótidos pueden usarse para enfoques de "dirección génica" o de "terapia génica". En otra realización las moléculas de ácido nucleico están
60 marcadas. Se conocen bien en la técnica métodos para la detección de ácidos nucleicos, por ejemplo, transferencia de Southern y Northern, PCR o extensión de cebadores. Esta realización puede ser útil para métodos de exploración para verificar la introducción con éxito de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente durante enfoques de terapia génica.

65 La molécula o las moléculas de ácido nucleico pueden ser una molécula de ácido nucleico quimérica que comprende

cualquiera de las moléculas de ácido nucleico anteriormente mencionadas solas o en combinación. En aspectos específicos, la molécula de ácido nucleico es parte de un vector.

La presente divulgación por lo tanto también se refiere a una composición que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico descrita en la presente divulgación.

Los expertos en biología molecular conocen muchos vectores adecuados, cuya elección dependería de la función deseada y que incluyen plásmidos, cósmidos, virus, bacteriófagos y otros vectores usados de forma convencional en ingeniería genética. Pueden usarse métodos que son bien conocidos por los expertos en la materia para construir diversos plásmidos y vectores; véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.* (1989) y Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1989), (1994). Como alternativa, los polinucleótidos y vectores de la divulgación pueden reconstituirse en liposomas para suministro a células diana. Puede usarse un vector de clonación para aislar secuencias individuales de ADN. Las secuencias relevantes pueden transferirse a vectores de expresión en los que es necesaria la expresión de un polipéptido particular. Los vectores de clonación típicos incluyen pBluescript SK, pGEM, pUC9, pBR322 y pGBT9. Los vectores de expresión típicos incluyen pTRE, pCAL-n-EK, pESP-1, pOP13CAT.

En realizaciones específicas, hay un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que es una secuencia reguladora unida operativamente con la secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR específico de CD138 definido en el presente documento. Dichas secuencias reguladoras (elementos de control) son conocidas por los expertos en la materia y pueden incluir un promotor, un casete de corte y empalme, codón de inicio de la traducción, sitio de traducción e inserción para introducir un inserto en el vector. En realizaciones específicas, la molécula de ácido nucleico está unida operativamente a dichas secuencias de control de la expresión que permiten expresión en células eucariotas o procariotas.

Se prevé que un vector es un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica un CAR específico de CD138 como se define en el presente documento. En aspectos específicos, el vector es un vector vírico, tal como un vector lentivírico. Están disponibles en el mercado vectores lentivíricos, incluyendo de Clontech (Mountain View, CA) o GeneCopoeia (Rockville, MD), por ejemplo.

La expresión "secuencia reguladora" se refiere a secuencias de ADN que son necesarias para efectuar la expresión de secuencias codificantes con las que se ligan. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo hospedador. En procariotas, las secuencias de control incluyen en general promotores, sitios de unión ribosómicos y terminadores. En eucariotas, en general, las secuencias de control incluyen promotores, terminadores y, en algunos casos, potenciadores, transactivadores o factores de transcripción. Se pretende que la expresión "secuencia de control" incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes ventajosos adicionales.

La expresión "unido operativamente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos de este modo están en una relación que permite que actúen de su manera pretendida. Una secuencia de control "unida operativamente" con una secuencia codificante se liga de tal manera que se consiga expresión de la secuencia codificante en condiciones compatibles con las secuencias de control. En caso de que la secuencia de control sea un promotor, es evidente para un experto en la materia que se usa preferentemente ácido nucleico bicatenario.

De este modo, el vector indicado es un vector de expresión, en determinadas realizaciones. Un "vector de expresión" es una construcción que puede usarse para transformar un hospedador seleccionado y posibilita la expresión de una secuencia codificante en el hospedador seleccionado. Los vectores de expresión pueden ser por ejemplo vectores de clonación, vectores binarios o vectores de integración. La expresión comprende transcripción de la molécula de ácido nucleico preferentemente en un ARNm traducible. Los expertos en la materia conocen bien elementos reguladores que aseguran la expresión en procariotas y/o células eucariotas. En el caso de células eucariotas comprenden normalmente promotores que aseguran el inicio de la transcripción y opcionalmente señales de poliA que aseguran la terminación de la transcripción y estabilización del transcrito. Los posibles elementos reguladores que permiten la expresión en células hospedadoras procariotas comprenden, por ejemplo, el promotor P_L, lac, trp o tac en *E. coli*, y son ejemplos de elementos reguladores que permiten la expresión en células hospedadoras eucariotas el promotor de AOX1 o GAL1 en levadura o el promotor de CMV, SV40, VSR (virus del sarcoma de Rous), potenciador de CMV, potenciador de SV40 o un intrón de globina en células de mamífero y otro animal.

Además de elementos que son responsables del inicio de la transcripción dichos elementos reguladores también pueden comprender señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio de poli A de SV40 o el sitio de poli A de tk, cadena abajo del polinucleótido. Además, dependiendo del sistema de expresión usado pueden añadirse secuencias líder capaces de dirigir el polipéptido a un compartimento celular o secretarlo al medio a la secuencia codificante de la secuencia de ácido nucleico enumerada y se conoce bien en la técnica. La secuencia o las secuencias líder se ensamblan en fase apropiada con secuencias de traducción, inicio y terminación, y, preferentemente, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de proteína traducida, o una parte de la misma, al espacio periplásmico o medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación N terminal que transmite características deseadas, por ejemplo,

estabilización o purificación simplificada de producto recombinante expresado; véase anteriormente. En este contexto, se conocen en la técnica vectores de expresión adecuados tales como el vector de expresión de ADNc de Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pEF-Neo, pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen), pEF-DHFR y pEF-ADA, (Raum *et al.* Cancer Immunol Immunother (2001) 50(3), 141-150) o pSPORT1 (GIBCO BRL).

En algunas realizaciones, las secuencias de control de la expresión son sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar células hospedadoras eucariotas, pero también pueden usarse secuencias de control para hospedadores procariotas. Una vez que el vector se ha incorporado en el hospedador apropiado, el hospedador se mantiene en condiciones adecuadas para expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos y, según se desee, se puede realizar a continuación la recogida y purificación del polipéptido de la divulgación. En realizaciones particulares, una o más secuencias codificables están reguladas por secuencias de control de la expresión que son sensibles a ambientes hipóxicos.

Los elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores de la transcripción así como de la traducción. Provechosamente, los vectores anteriormente descritos de la divulgación comprenden un marcador seleccionable y/o puntuable. Los expertos en la materia conocen bien genes marcadores seleccionables útiles para la selección de células transformadas y estos comprenden, por ejemplo, resistencia a antimetabolitos como la base para la selección de dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Reiss, Plant Physiol. (Life-Sci. Adv.) 13 (1994), 143-149); npt, que confiere resistencia a los aminoglucósidos neomicina, kanamicina y paromicina (Herrera-Estrella, EMBO J. 2 (1983), 987-995) e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Marsh, Gene 32 (1984), 481-485). Se han descrito genes seleccionables adicionales, concretamente trpB, que permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano; hisD, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 8047); manosa-6-fosfato isomerasa que permite que las células utilicen manosa (documento WO 94/20627) y ODC (ornitina descarboxilasa) que confiere resistencia al inhibidor de ornitina descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue, 1987, en: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.) o desaminasa de *Aspergillus terreus* que confiere resistencia a Blastidina S (Tamura, Biosci. Biotechnol. Biochem. 59 (1995), 2336-2338).

Los expertos en la materia también conocen marcadores puntuables útiles y estos están disponibles en el mercado. Provechosamente, dicho marcador es un gen que codifica luciferasa (Giacomin, Pl. Sci. 116 (1996), 59-72; Scikantha, J. Bact. 178 (1996), 121), proteína verde fluorescente (Gerdes, FEBS Lett. 389 (1996), 44-47) o β -glucuronidasa (Jefferson, EMBO J. 6 (1987), 3901-3907). Esta realización es particularmente útil para exploración sencilla y rápida de células, tejidos y organismos que contienen un vector indicado.

Como se ha descrito anteriormente, la molécula de ácido nucleico indicada puede usarse en una célula, sola, o como parte de un vector para expresar el polipéptido codificado en células. Las moléculas de ácido nucleico o vectores que contienen la o las secuencias de ADN que codifican una cualquiera de las construcciones de CAR específico CD138 se introducen en las células que a su vez producen el polipéptido de interés. Las moléculas de ácido nucleico y vectores indicados pueden diseñarse para su introducción directa o para introducción mediante liposomas o vectores víricos (por ejemplo, adenovíricos, retrovíricos) en una célula. En determinadas realizaciones, las células son linfocitos T, linfocitos T CAR, linfocitos NK, linfocitos NKT, MSC, células madre neuronales o células madre hematopoyéticas, por ejemplo.

De acuerdo con lo anterior, la presente divulgación se refiere a métodos para obtener vectores, particularmente plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos usados convencionalmente en ingeniería genética que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia polipeptídica de un CAR específico de CD138 definido en el presente documento. Preferentemente, dicho vector es un vector de expresión y/o un vector de transferencia o dirección génica. Los vectores de expresión que proceden de virus tales como retrovirus, virus vaccinia, virus adenoasociados, virus de del herpes o virus del papiloma bovino, pueden usarse para el suministro de los polinucleótidos o el vector enumerados en poblaciones de células diana. Pueden usarse métodos que son bien conocidos por los expertos en la materia para construir vectores recombinantes; véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.* (en el lugar citado), Ausubel (1989, en el lugar citado) u otros libros de texto convencionales. Como alternativa, las moléculas de ácido nucleico y vectores enumerados pueden reconstituirse en liposomas para suministro a células diana. Los vectores que contienen las moléculas de ácido nucleico de la divulgación pueden transferirse a la célula hospedadora mediante métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de hospedador celular. Por ejemplo, habitualmente se utiliza transfección con cloruro de calcio para células procariotas, mientras que puede usarse tratamiento con fosfato de calcio o electroporación para otros hospedadores celulares; véase Sambrook, mencionado anteriormente.

XII. Vectores en general

Los vectores de la divulgación pueden usarse para ingeniería recombinante para producir, y al menos en algunos casos expresar, un resto de reconocimiento específico de CD138, incluyendo un CAR específico de CD138 o una molécula de interacción específica de CD138.

El término "vector" se usa para hacer referencia a una molécula de ácido nucleico transportadora en la que puede

insertarse una secuencia de ácido nucleico para introducción en una célula en la que puede replicarse. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "exógena", lo que significa que es ajena a la célula en la que el vector se introduce o que la secuencia es homóloga de una secuencia en la célula pero está en una posición dentro del ácido nucleico de la célula hospedadora en el que la secuencia no se encuentra habitualmente. Los vectores incluyen

- 5 plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus animales y virus vegetales) y cromosomas artificiales (por ejemplo YAC). Un experto en la materia estaría bien equipado para construir un vector mediante técnicas recombinantes convencionales (véase, por ejemplo, Maniatis *et al.*, 1988 y Ausubel *et al.*, 1994, ambas incorporadas en el presente documento por referencia).
- 10 La expresión "vector de expresión" se refiere a cualquier tipo de construcción genética que comprenda un ácido nucleico que codifique un ARN capaz de transcribirse. En algunos casos, las moléculas de ARN se traducen después a una proteína, un polipéptido o un péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas antisentido o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener una diversidad
- 15 de "secuencias de control", que se refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia codificante unida operativamente en una célula hospedadora particular. Además de secuencias de control que guían la transcripción y la traducción, los vectores y vectores de expresión pueden contener secuencias de ácidos nucleicos que cumplen también otras funciones y se han descrito anteriormente.

- 20 Las secuencias reguladoras empleadas en la divulgación incluyen uno o más elementos sensibles a hipoxia que están unidos funcionalmente a la construcción de expresión cuya expresión está regulada. A continuación se describen otros elementos reguladores que pueden emplearse.

- Un "promotor" es una secuencia de control que es una región de una secuencia de ácido nucleico en la que el inicio
- 25 y la tasa de transcripción están controlados. Puede contener elementos genéticos en los que pueden unirse proteínas y moléculas reguladoras, tales como ARN polimerasa y otros factores de transcripción, para iniciar la transcripción específica de una secuencia de ácido nucleico. Las expresiones "situado operativamente", "unido operativamente", "bajo el control", y "bajo el control transcripcional" significan que un promotor está en una localización y/u orientación funcional correcta en relación con una secuencia de ácido nucleico para controlar el inicio
- 30 de la transcripción y/o la expresión de esa secuencia.

- Un promotor comprende en general una secuencia que actúa para situar el sitio de inicio para síntesis de ARN. El ejemplo mejor conocido de esto es la caja TATA, pero en algunos promotores que carecen de caja TATA, tales como, por ejemplo, el promotor para el gen de la desoxinucleotidil transferasa terminal de mamífero y el promotor
- 35 para los genes tardíos de SV40, un elemento discreto que se superpone con el sitio de inicio en sí mismo ayuda a fijar el lugar de inicio. Elementos promotores adicionales regulan la frecuencia de inicio de la transcripción. Típicamente, estos se localizan en la región 30-110 pb cadena arriba del sitio de inicio, aunque se ha mostrado que varios promotores contienen elementos funcionales cadena abajo del sitio de inicio también. Para poner una secuencia codificante "bajo el control de" un promotor, se sitúa el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción de
- 40 la fase de lectura transcripcional "cadena abajo" (es decir, 3') del promotor elegido. El promotor "cadena arriba" estimula la transcripción del ADN y promueve la expresión del ARN codificado.

- La separación entre elementos promotores es con frecuencia flexible, de modo que la función promotora está conservada cuando los elementos se invierten o se mueven uno en relación con el otro. En el promotor de tk, la
- 45 separación entre elementos promotores puede aumentarse hasta 50 pb de distancia antes de que la actividad comience a disminuir. Dependiendo del promotor, parece que elementos individuales pueden actuar de forma cooperativa o independiente para activar la transcripción. Un promotor puede usarse o no junto con un "potenciador", que se refiere a una secuencia reguladora de acción en *cis* implicada en la activación transcripcional de una secuencia de ácido nucleico.

- 50 Un promotor puede ser uno asociado de forma natural con una secuencia de ácido nucleico, como puede obtenerse aislando las secuencias 5' no codificantes localizadas cadena arriba del segmento codificante y/o exón. Dicho promotor puede denominarse "endógeno". De forma similar, un potenciador puede ser uno asociado de forma natural con una secuencia de ácido nucleico, localizado cadena abajo o cadena arriba de esa secuencia. Como
- 55 alternativa, se obtendrán ciertas ventajas al situar el segmento de ácido nucleico codificante bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo, que se refiere a un promotor que normalmente no está asociado con una secuencia de ácido nucleico en su ambiente natural. Un potenciador recombinante o heterólogo se refiere también a un potenciador que normalmente no está asociado con una secuencia de ácido nucleico en su ambiente natural. Dichos promotores o potenciadores pueden incluir promotores o potenciadores de otros genes, y promotores o potenciadores aislados de cualquier otro virus, o célula procariota o eucariota, y promotores o potenciadores que no son "de origen natural", es decir, que contienen diferentes elementos de diferentes regiones reguladoras de la transcripción y/o mutaciones que alteran la expresión. Por ejemplo, los promotores que se usan más habitualmente en construcción de ADN recombinante incluyen los sistemas promotores de β -lactamasa (penicilinasa), lactosa y triptófano (trp). Además de producir secuencias de ácido nucleico de promotores y potenciadores de forma sintética,
- 60 pueden producirse secuencias usando tecnología de amplificación de ácidos nucleicos y/o de clonación recombinante, incluyendo PCRTM, en relación con las composiciones desveladas en el presente documento (véase
- 65

patentes de los Estados Unidos n.º 4.683.202 y 5.928.906, cada una incorporada en el presente documento por referencia). Además, se contempla que las secuencias de control que dirigen la transcripción y/o expresión de secuencias en orgánulos no nucleares tales como mitocondrias, cloroplastos y similares, también pueden emplearse.

- 5 Naturalmente, será importante emplear un promotor y/o potenciador que dirija eficazmente la expresión del segmento de ADN en el orgánulo, tipo celular, tejido, órgano u organismo elegido para expresión. Los expertos en la materia de la biología molecular conocen en general el uso de promotores, potenciadores y combinaciones de tipos celulares para expresión de proteínas, (véase, por ejemplo Sambrook *et al.* 1989, incorporado en el presente documento por referencia). Los promotores empleados pueden ser constitutivos, específicos de tejido, inducibles y/o
10 útiles en las condiciones apropiadas para dirigir alto nivel de expresión del segmento de ADN introducido, tal como es ventajoso en la producción a gran escala de proteínas y/o péptidos recombinantes. El promotor puede ser heterólogo o endógeno.

- 15 Adicionalmente también podría usarse cualquier combinación de promotor/potenciador para conducir la expresión. El uso de un sistema de expresión citoplasmático de T3, T7 o SP6 es otra realización posible. Las células eucariotas puede soportar la transcripción citoplasmática de determinados promotores bacterianos si se proporciona la polimerasa bacteriana apropiada, como parte del complejo de suministro o como una construcción de expresión genética adicional.

- 20 La identidad de promotores o elementos específicos de tejido, así como ensayos para caracterizar su actividad, son bien conocidos por los expertos en la materia. En realizaciones específicas, se utilizan promotores o elementos específicos de ambiente, tales como elementos reguladores específicos de hipoxia. Pueden emplearse promotores específicos de tejido, específicos de linaje y/o específicos de activación, y los ejemplos incluyen elementos de linfocitos T activados, NFAT (activación restringida por linaje), gen de respuesta de crecimiento temprano (activación), elementos de respuesta a receptor X del hígado (activación), elementos de respuesta a hipoxia (ambiental), etc.

- 25 También puede ser necesaria una señal de inicio específica para la traducción eficaz de secuencias codificantes. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG o secuencias adyacentes. Puede ser necesario proporcionar señales de control de la traducción exógenas, incluyendo el codón de inicio ATG. Un experto habitual en la materia sería fácilmente capaz de determinar esto y proporcionar las señales necesarias.

- 30 En determinadas realizaciones de la divulgación, el uso de sitios de entrada de ribosomas internos (IRES) se usan para crear mensajes multigénicos, o policistronicos, y estos pueden usarse en la divulgación.

- 35 Los vectores pueden incluir un sitio de clonación múltiple (MCS), que es una región de ácido nucleico que contiene múltiples sitios de enzimas de restricción, cualquiera de los cuales puede usarse junto con tecnología recombinante convencional para digerir el vector. "Digestión con enzimas de restricción" se refiere a escisión catalítica de una molécula de ácido nucleico con una enzima que actúa solamente en localizaciones específicas en una molécula de
40 ácido nucleico. Muchas de estas enzimas de restricción están disponibles en el mercado. El uso de dichas enzimas es entendido ampliamente por los expertos en la materia. Frecuentemente, un vector se linealiza o se fragmenta usando una enzima de restricción que corta el MCS para permitir que secuencias exógenas se ligen con el vector. El "ligamiento" se refiere al proceso de formar enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico, que pueden ser o no contiguos entre sí. Los expertos en la materia de la tecnología recombinantes conocen bien técnicas que implican enzimas de restricción y reacciones de ligamiento.

También pueden emplearse sitios de corte y empalme, señales de terminación, orígenes de replicación y marcadores seleccionables.

- 50 En determinadas realizaciones, se contempla un vector plasmídico para su uso para transformar una célula hospedadora. En general, se usan vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicón y control que proceden de especies compatibles con la célula hospedadora en relación con estos hospedadores. El vector normalmente porta un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. En un ejemplo no limitante, *E. coli* se transforma con frecuencia
55 usando derivados de pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina y tetraciclina y, por lo tanto, proporciona medios fáciles para identificar células transformadas. El plásmido pBR, u otro plásmido microbiano o fago, también debe contener, o modificarse para contener, por ejemplo, promotores que puede ser usados por el organismo microbiano para la expresión de sus propias proteínas.

- 60 Además, los vectores de fagos que contienen secuencias de replicón y control que son compatibles con el microorganismo hospedador pueden usarse como vectores de transformación en relación con estos hospedadores. Por ejemplo, se puede utilizar el fago lambda GEM™-11 en la preparación de un vector recombinante que se puede usar para transformar células hospedadoras, tales como, por ejemplo, *E. coli* LE392.

- 65 Los vectores plasmídicos útiles adicionales incluyen vectores pIN (Inouye *et al.*, 1985); y vectores pGEX, para su uso

en la generación de proteínas de fusión solubles en glutatión S-transferasa (GST) para su posterior purificación y separación o escisión. Otras proteínas de fusión adecuadas son las que tienen β -galactosidasa, ubiquitina, y similares.

Se cultivan células hospedadoras bacterianas, por ejemplo, *E. coli*, que comprenden el vector de expresión, en cualquiera de varios medios adecuados, por ejemplo, LB. La expresión de la proteína recombinante en determinados vectores puede inducirse, como entenderían los expertos en la materia, poniendo en contacto una célula hospedadora con un agente específico para determinados promotores, por ejemplo, añadiendo IPTG al medio o cambiando la incubación a una temperatura mayor. Después de cultivar las bacterias durante un periodo adicional, en general de entre 2 y 24 h, las células se recogen por centrifugación y se lavan para retirar medio residual.

A. Vectores víricos

La capacidad de determinados virus para infectar células o entrar en células mediante endocitosis mediada por receptor y para integrar en el genoma de la célula hospedadora y expresar genes víricos de forma estable y eficaz los ha hecho candidatos atractivos para la transferencia de ácidos nucleicos ajenos a células (por ejemplo, células de mamífero). Los componentes de la presente divulgación pueden ser un vector vírico que codifique heparanasa. Se describen a continuación ejemplos no limitantes de vectores víricos que pueden usarse para suministrar un ácido nucleico de la presente divulgación.

1. Vectores adenovíricos

Un método particular para el suministro del ácido nucleico implica el uso de un vector de expresión de adenovirus. Aunque se sabe que los vectores de adenovirus tienen una baja capacidad para integración en ADN genómico, este elemento está contrarrestado por la alta eficacia de transferencia génica proporcionada por estos vectores. Se entiende que el "vector de expresión de adenovirus" incluye las construcciones que contienen secuencias de adenovirus suficientes para (a) soportar el empaquetamiento de la construcción y (b) en última instancia expresar una construcción específica de tejido o célula que se ha clonado en el mismo. El conocimiento de la organización genética del adenovirus, un virus de ADN bicatenario, lineal, de 36 kb, permite la sustitución de grandes trozos de ADN adenovírico con secuencias extrañas de hasta 7 kb (Grunhaus y Horwitz, 1992).

2. Vectores de VAA

El ácido nucleico puede introducirse en la célula usando transfección asistida por adenovirus. Se han indicado eficacias de transfección aumentadas en sistemas celulares usando sistemas acoplados a adenovirus (Kelleher y Vos, 1994; Cotten *et al.*, 1992; Curiel, 1994). El virus adenoasociado (VAA) es un sistema de vector atractivo para su uso en las células de la presente divulgación ya que tiene una alta frecuencia de integración y puede infectar células que no están en división, lo que lo hace por lo tanto útil para el suministro de genes a células de mamífero, por ejemplo, en cultivo tisular (Muzyczka, 1992) o *in vivo*. El VAA tiene un amplio rango de hospedadores para infecciosidad (Tratschin *et al.*, 1984; Laughlin *et al.*, 1986; Lebkowski *et al.*, 1988; McLaughlin *et al.*, 1988). Se describen detalles con respecto a la generación y el uso de vectores rAAV en la patente de Estados Unidos n.º 5.139.941 y 4.797.368, cada una incorporada en el presente documento por referencia.

3. Vectores retrovíricos

Los retrovirus son útiles como vectores de suministro debido a su capacidad de integrar sus genes en el genoma del hospedador, transferir una gran cantidad de material genético ajeno, infectar un amplio espectro de especies y tipos celulares y de empaquetarse en líneas celulares especiales (Miller, 1992).

Para construir un vector retrovítico de heparanasa, se inserta un ácido nucleico (por ejemplo, uno que codifica parte de o toda la heparanasa) en el genoma vírico en lugar de determinadas secuencias víricas para producir un virus que es defectuoso para replicación. Para producir viriones, se construye una línea celular que contiene los genes *gag*, *pol* y *env* pero sin el LTR y componentes de empaquetamiento (Mann *et al.*, 1983). Cuando se introduce un plásmido recombinante que contiene un ADNc, junto con el LTR retrovítico y secuencias de empaquetamiento en una línea celular especial (por ejemplo, mediante precipitación con fosfato de calcio), la secuencia de empaquetamiento permite que el transcrito de ARN del plásmido recombinante se empaquete en partículas víricas, que después se secretan al medio de cultivo (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann *et al.*, 1983). Después se recoge el medio que contiene los retrovirus recombinantes, opcionalmente se concentra, y se usa para transferencia génica. Los vectores retrovíricos son capaces de infectar una amplia diversidad de tipos celulares. Sin embargo, la integración y expresión estable requieren la división de células hospedadoras (Paskind *et al.*, 1975).

Los lentivirus son retrovirus complejos, que, además de los genes retrovíricos comunes *gag*, *pol* y *env*, contienen otros genes con función reguladora o estructural. Los vectores lentivíricos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Naldini *et al.*, 1996; Zufferey *et al.*, 1997; Blomer *et al.*, 1997; Patentes de los Estados Unidos n.º 6.013.516 y 5.994.136). Algunos ejemplos de lentivirus incluyen los virus de la inmunodeficiencia humana: VIH-1, VIH-2 y el virus de la inmunodeficiencia de simios: VIS. Se han generado vectores lentivíricos atenuando de forma

múltiple los genes de virulencia del VIH, por ejemplo, los genes *env*, *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* se suprimen haciendo el vector biológicamente seguro.

Los vectores lentivíricos recombinantes son capaces de infectar células que no están en división y pueden usarse para transferencia génica tanto *in vivo* como *ex vivo* y expresión de secuencias de ácido nucleico. Por ejemplo, un lentivirus recombinante capaz de infectar una célula que no está en división en el que una célula hospedadora adecuada se transfecta con dos o más vectores que portan las funciones de empaquetamiento, concretamente gag, pol y env, así como rev y tat se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 5.994.136, incorporado por referencia en el presente documento. Se puede dirigir el virus recombinante por enlace de la proteína de envoltura con un anticuerpo o un ligando particular para dirigir a un receptor de un tipo celular particular. Insertando una secuencia (incluyendo una región reguladora) de interés en el vector vírico, junto con otro gen que codifica el ligando para un receptor en una célula diana específica, por ejemplo, el vector es ahora específico de diana.

4. Otros vectores víricos

Pueden emplearse otros vectores víricos como construcciones de vacuna en la presente divulgación. Pueden emplearse vectores derivados de virus tales como virus vaccinia (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988), virus sindbis, citomegalovirus y virus del herpes simple. Ofrecen varios elementos atractivos para diversas células de mamífero (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988; Horwich *et al.*, 1990).

5. Suministro usando vectores modificados

Un ácido nucleico para suministrar puede alojarse en un virus infeccioso que se ha modificado técnicamente para expresar un ligando de unión específica. La partícula vírica se unirá por lo tanto específicamente con los receptores afines de la célula diana y suministrará los contenidos a la célula. Se desarrolló un nuevo enfoque diseñado para permitir la dirección específica de vectores de retrovirus basándose en la modificación química de un retrovirus por la adición química de restos de lactosa a la envoltura vírica. Esta modificación puede permitir la infección específica de hepatocitos mediante receptores de sialoglucoproteína.

Se diseñó otro enfoque para la dirección de retrovirus recombinantes en el que se usaron anticuerpos biotinilados contra una proteína de envoltura retroviral y contra un receptor celular específico. Los anticuerpos se acoplaron mediante los componentes de biotina usando estreptavidina (Roux *et al.*, 1989). Usando anticuerpos contra antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y clase II, demostraron la infección de una diversidad de células humanas que portaban esos antígenos de superficie con un virus ecotrópico *in vitro* (Roux *et al.*, 1989).

B. Suministro de vector y transformación celular

Los expertos en la materia conocen métodos adecuados para el suministro de ácido nucleico para transfección o transformación de células. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, suministro directo de ADN tal como mediante transfección *ex vivo*, mediante inyección, etc. A través de la aplicación de técnicas conocidas en este campo, las células pueden transformarse de forma estable o transitoria.

C. Transformación *ex vivo*

Los expertos en la materia conocen métodos para transfectar células y tejidos eucariotas retirados de un organismo en un entorno *ex vivo*. De este modo, se contempla que pueden retirarse células o tejidos y transfectarse *ex vivo* usando heparanasa u otros ácidos nucleicos de la presente divulgación. En aspectos particulares, las células o los tejidos trasplantados pueden colocarse en un organismo. En facetas preferidas, se expresa un ácido nucleico en las células trasplantadas.

XIII. Terapia de combinación

En determinadas realizaciones de la divulgación, los métodos de la presente divulgación para un aspecto clínico, por ejemplo, la administración a un individuo que tiene células inmunitarias de cáncer que expresan CD138, por ejemplo, linfocitos T, que expresan un CAR específico de CD138, se combinan con otros agentes eficaces en el tratamiento de enfermedad hiperproliferativa, tales como agentes antineoplásicos. Un agente "antineoplásico" es capaz de afectar negativamente al cáncer en un sujeto, por ejemplo, destruyendo células cancerosas, induciendo apoptosis en células cancerosas, reduciendo la tasa de crecimiento de células cancerosas, reduciendo la incidencia o el número de metástasis, reduciendo el tamaño del tumor, inhibiendo el crecimiento del tumor, reduciendo el aporte sanguíneo a un tumor o células cancerosas, promoviendo una respuesta inmunitaria contra células cancerosas o un tumor, previniendo o inhibiendo la progresión de cáncer, o aumentando la esperanza de vida de un sujeto con cáncer. De manera más general, estas otras composiciones se proporcionarían en una cantidad combinada eficaz para destruir o inhibir la proliferación de la célula. Este proceso puede implicar poner en contacto las células cancerosas con la construcción de expresión y el agente o los agentes o un factor o factores múltiples al mismo tiempo. Esto puede conseguirse poniendo en contacto la célula con un única composición o formulación farmacológica que incluye

ambos agentes, o poniendo en contacto la célula con dos composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo, en donde una composición incluye la construcción de expresión y la otra incluye el segundo agente o los segundos agentes.

- 5 En realizaciones de la divulgación, uno o más de los siguientes se proporcionan a un individuo con MM además de las células terapéuticas de la divulgación: esteroides, quimioterapia, inhibidores de proteasomas (por ejemplo, bortezomib), fármacos inmunomoduladores (IMiD) tales como talidomida o lenalidomida, radiación y/o trasplantes de células madre.
- 10 La resistencia de células tumorales a quimioterapia y agentes radioterapéuticos representa un problema importante en oncología clínica. Un objetivo de la investigación de cáncer actual es encontrar modos de mejorar la eficacia de quimio y radioterapia combinándola con terapia génica. Por ejemplo, el gen de timidina quinasa del herpes simple (HS-tk), cuando se suministra a tumores cerebrales por un sistema de vector retroviral, indujo con éxito susceptibilidad al agente antiviral ganciclovir (Culver, *et al.*, 1992). En el contexto de la presente divulgación, se
- 15 contempla que podría usarse terapia celular de forma similar junto con intervención quimioterapéutica, radioterapéutica o inmunoterapéutica, además de otros agentes reguladores del ciclo celular o proapoptóticos.

Como alternativa, la presente terapia de la invención puede preceder o seguir al otro tratamiento de agente por intervalos que varían de minutos a semanas. En realizaciones en las que el otro agente y la presente divulgación se aplican por separado al individuo, en general, se aseguraría de que no pase un período de tiempo significativo entre el momento de cada administración, de modo que el agente y la terapia de la invención aún sean capaces de ejercer un efecto ventajosamente combinado sobre la célula. En dichos casos, se contempla que se puede poner en contacto la célula con ambas modalidades en un periodo de aproximadamente 12-24 h entre sí y, más preferentemente, en un periodo de aproximadamente 6-12 h entre sí. En algunas situaciones, puede ser deseable

20 extender el periodo de tiempo para tratamiento significativamente, sin embargo, donde transcurren de varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) entre las administraciones respectivas.

Pueden emplearse diversas combinaciones, la presente divulgación es "A" y el agente secundario, tal como radio o quimioterapia, es "B":

30 A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

35 B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario. También se contempla que diversas terapias convencionales, así como intervención quirúrgica, pueden aplicarse en combinación con la terapia de células de la invención.

40 A. Quimioterapia

Las terapias de cáncer también incluyen una diversidad de terapias de combinación con tratamientos basados tanto en productos químicos como en radiación. Las quimioterapias de combinación incluyen, por ejemplo, acivicina;

45 aclarrubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleukina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; amsacrina; anastrozol; antramicina; asparaginasa; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar de sodio; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetímero; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; celecoxib (inhibidor de COX-2);

50 clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de danorrubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diazicuona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflornitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato de sodio de estramustina; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; fluorocitabina; fosquidona; fostriecina de sodio; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxiurea; clorhidrato de idarrubicina; ifosfamida; ilmofosina; ioplatino; irinotecán; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; lometrexol de sodio; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogarilo; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato de sodio;

60 metoprina; meturedpa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogillina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido mifofenólico; nocodazol; nogalamina; ormaplatino; oxisurano; paclitaxel; pegaspargasa; peliomina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromán; piposulfano; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puomicina; clorhidrato de puomicina; pirazofurina; riboprina; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato de sodio; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina;

65

espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalano de sodio; taxotere; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporquina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vaporeotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; clorhidrato de zorubicina; 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarrubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleukina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografólido; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína morfogenética antidorsalizante 1; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplastón; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores de genes de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de baccatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilestaurosorina; derivados de beta lactama; beta-aletina; betaclamina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; sulfoximina de butionina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camptotecina; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartilago; carzelesina; inhibidores de caseína quinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetorelix; clorinas; sulfonamida de cloroquinoxalina; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshiodridenmina B; desloreline; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamilo; diazicuona; didemnina B; didox; dietilnoespermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; difenil espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxifluridina; doxorubicina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; emitefur; epirubicina; epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrógeno; antagonistas de estrógeno; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; texafirina de gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatón; hepsulfam; herregulina; hexametileno bisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofofina; ilomastat; imatinib (por ejemplo, GLEEVEC®), imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor del factor de crecimiento de tipo insulínico 1; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorrubicina; ipomeanol, 4-; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplakinolida; kahalalida F; triacetato de lamelarina-N; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinano; leptostatina; letrozol; factor inhibidor de leucemia; interferón alfa de leucocitos; leuprolida+estrógeno+progesterona; leuporelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido de disacárido lipófilo; compuestos de platino lipófilos; lissoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; loxoribina; lurtotecán; texafirina de lutecio; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocól; maspin; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteínasa de la matriz; menogarilo; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; factor de crecimiento de fibroblastos mitoxina-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; Erbitux, gonadotropina coriónica humana; monofosforil lípido A+sk de pared celular de micobacteria; mopidamol; agente antineoplásico de mostaza; micaperoxido B; extracto de pared celular micobacteriana; miriaporona; N-acetilidinalina; benzamidas N sustituidas; nafareline; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridrónico; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; antioxidante de nitrógeno; nitrulina; oblimersen (GENA-SENSE®); octróido de O⁶-benilguanina; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracina; inductor de citocina oral; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; polisulfato de pentosán sódico; pentostatina; pentrozol; perflubron; perfosfamida; alcohol perilífico; fenacinomicina; fenilacetato; inhibidores de fosfatasa; picibanilo; clorhidrato de pilocarpina; pirarrubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor del activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfímero sódico; porfíromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores de proteasomas; modulador inmunitario basado en proteína A; inhibidor de la proteína quinasa C; inhibidores de la proteína quinasa C, de microalgas; inhibidores de proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de polioxietileno de hemoglobina piridoxilado; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de la proteína ras farnesil transferasa; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; RII retinamida; rohitucina; romurtida; roquimex; rubiginona B1; ruboxilo; safingol; saintopina; SarCNU; sarcofitol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidor derivado de senescencia 1; oligonucleótidos con sentido; inhibidores de la transducción de señales; sizofurano; sobuzoxano; borocaptato de sodio; fenilacetato de sodio; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiostatina 1; escualamina; estipiamida; inhibidores de estromelina; sulfinosina; antagonista de péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; talimustina; metyoduro de tamoxifeno; tauromustina; tazaroteno; tecogalano de sodio; tegafur; telurapirilio; inhibidores de telomerasa; temoporquina; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina;

taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista de receptor de timopoyetina; timotrinano; hormona estimulante tiroidea; etiopurpurina de etilo de estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterida; inhibidores de tirosina quinasa; tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor
 5 inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de uroquinasa; vaporeotida; variolina B; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y estimalámero de zinostatina, o cualquier variante análoga o derivada de los anteriores.

B Radioterapia

Otros factores que provocan daño de ADN y se han usado exhaustivamente incluyen los que se conocen habitualmente como rayos γ, rayos X y/o el suministro dirigido de radioisótopos a células tumorales. También se contemplan otras formas de factores de daño de ADN tales como microondas e irradiación de UV. Es más probable
 10 que todos estos factores efectúen un amplio intervalo de daño en ADN, en los precursores de ADN, en la replicación y reparación de ADN y en el ensamblaje y mantenimiento de cromosomas. Los intervalos de dosificación para rayos X varían de dosis diarias de 50 a 200 roentgens durante periodos de tiempo prolongados (de 3 a 4 semanas) a dosis
 15 individuales de 2000 a 6000 roentgens. Los intervalos de dosificación para radioisótopos varían ampliamente y dependen de la semivida del isótopo, la fuerza y el tipo de radiación emitida y la captación por las células neoplásicas.

Las expresiones "puesta en contacto" y "expuesta", cuando se aplican a una célula, se usan en el presente documento para describir el proceso por el que una construcción terapéutica y un agente quimioterapéutico o
 20 radioterapéutico se suministran a una célula diana o se colocan en yuxtaposición directa con la célula diana. Para conseguir destrucción o estasis celular, ambos agentes se suministran a una célula en una cantidad combinada eficaz para destruir la célula o evitar que se divida.

C. Inmunoterapia

Una inmunoterapia distinta del resto de reconocimiento específico de CD138 (linfocitos T que expresan CAR
 30 específico de CD138 o linfocitos T con moléculas de interacción específicas de CD 13 8) puede emplearse junto con los métodos de la presente divulgación.

Los productos inmunoterapéuticos generalmente se basan en el uso de células efectoras inmunitarias y moléculas para dirigirse a y destruir células cancerosas. El efector inmunitario puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico
 35 para algún marcador en la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo solo puede actuar como un efector de terapia o puede reclutar otras células para efectuar realmente destrucción de células. El anticuerpo también puede conjugarse con un fármaco o una toxina (producto quimioterapéutico, radionúclido, cadena A de ricina, toxina del cólera, toxina de pertussis, etc.) y actúan únicamente como un agente de dirección. Como alternativa, el efector puede ser un linfocito que porta una molécula de superficie que interacciona, bien directa o bien indirectamente, con
 40 una diana de célula tumoral. Diversas células efectoras incluyen linfocitos T, linfocitos T citotóxicos, linfocitos NK y linfocitos NKT.

La inmunoterapia podría usarse por lo tanto como parte de una terapia combinada, junto con la presente terapia celular. El enfoque general para terapia combinada se analiza posteriormente. En general, la célula tumoral debe
 45 portar algún marcador que sea susceptible a dirección, es decir, no está presente en la mayoría de otras células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de estos puede ser adecuado para dirección en el contexto de la presente divulgación. Los marcadores tumorales habituales incluyen antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, antígeno asociado a tumor urinario, antígeno fetal, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, antígeno sialilo de Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrógenos, receptor de laminina, erb B, p155, antígeno
 50 asociado a melanoma (MAGE), antígeno de melanoma expresado de forma preferente (PRAME), survivina, CD19, CD20, CD22, cadena ligera k, CD30, CD33, CD123, CD38, ROR1, ErbB2, ErbB3/4, dímeros de ErbB, EGFr VIII, antígeno carcinoembrionario, EGP2, EGP40, mesotelina, TAG72, PSMA, ligandos de NKG2D, B7-H6, receptor de IL-13 a2, MUC1, MUC16, CA9, GD2, GD3, HMW-MAA, CD171, Lewis Y, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, receptor de folato a, CD44v6, CD44v7/8, integrina αvβ6, 8H9, NCAM, receptores de VEGF, 5T4,
 55 AchR fetal, ligandos de NKG2D, CD44v6, antígeno doble y universal.

D. Genes

El tratamiento secundario puede ser una terapia génica en la que un polinucleótido terapéutico se administra antes,
 60 después o al mismo tiempo que las realizaciones clínicas de la presente divulgación. La divulgación abarca una diversidad de productos de expresión, incluyendo inductores de proliferación celular, inhibidores de proliferación celular o reguladores de muerte celular programada.

E. Cirugía

Aproximadamente el 60 % de las personas con cáncer experimentarán cirugía de algún tipo, que incluye cirugía

preventiva, de diagnóstico o estadificación, curativa o paliativa. La cirugía curativa es un tratamiento de cáncer que puede usarse junto con otras terapias, tal como el tratamiento de la presente divulgación, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia génica, inmunoterapia y/o terapias alternativas.

La cirugía curativa incluye resección en la que todo o parte del tejido canceroso se retira físicamente, se escinde y/o se destruye. La resección tumoral se refiere a la retirada física de al menos parte de un tumor. Además de la resección tumoral, el tratamiento por cirugía incluye cirugía por láser, criocirugía, electrocirugía y cirugía controlada microscópicamente (cirugía de Mohs). Se contempla adicionalmente que la presente divulgación puede usarse junto con la retirada de cánceres superficiales, precánceres o cantidades incidentales de tejido normal.

Tras la escisión de parte de todas las células cancerosas, tejido o tumor, puede formarse una cavidad en el cuerpo. El tratamiento puede conseguirse por perfusión, inyección directa o aplicación local del área con una terapia antineoplásica adicional. Dicho tratamiento puede repetirse, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, o cada 1, 2, 3, 4 y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. Estos tratamientos pueden ser también de diversas dosificaciones.

F. Otros agentes

Se contempla que pueden usarse otros agentes en combinación con la presente divulgación para mejorar la eficacia terapéutica de tratamiento. Estos agentes adicionales incluyen agentes inmunomoduladores, agentes que afectan a la regulación positiva de receptores de superficie celular y puntos de unión comunicante, agentes citostáticos y de diferenciación, inhibidores de la adhesión celular o agentes que aumentan la sensibilidad de las células hiperproliferativas a inductores de la apoptosis. Los agentes inmunomoduladores incluyen factor de necrosis tumoral; interferón alfa, beta y gamma; IL-2 y otras citocinas; F42K y otros análogos de citocinas; o MIP-1, MIP-1beta, MCP-1, RANTES y otras quimiocinas. Se contempla además que la regulación positiva de receptores de superficie celular o sus ligandos tales como Fas / ligando de Fas, DR4 o DR5 / TRAIL potenciaría las capacidades de inducción de la apoptosis de la presente divulgación mediante establecimiento de un efecto autocrino o paracrino en células hiperproliferativas. El aumento de la señalización intercelular elevando el número de uniones comunicantes aumentaría los efectos antihiperproliferativos en la población de células hiperproliferativas adyacentes. En otras realizaciones, pueden usarse agentes citostáticos o de diferenciación en combinación con la presente divulgación para mejorar la eficacia antihiperproliferativa de los tratamientos. Se contemplan inhibidores de la adhesión celular para mejorar la eficacia de la presente divulgación. Son ejemplos de inhibidores de la adhesión celular inhibidores de la quinasa de adhesión focal (FAK) y lovastatina. Se contempla además que otros agentes que aumentan la sensibilidad de una célula hiperproliferativa a la apoptosis, tales como el anticuerpo c225, podrían usarse en combinación con la presente divulgación para mejorar la eficacia del tratamiento.

XII. Composiciones farmacéuticas

De acuerdo con la presente divulgación, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a una composición para administración a un individuo. En aspectos específicos de la divulgación, la composición farmacéutica comprende una pluralidad de células inmunitarias dirigidas a antígeno CD138 en células cancerosas. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende una composición para administración parenteral, transdérmica, intraluminal, intraarterial, intratecal o intravenosa o para inyección directa en un cáncer. Se prevé en particular que dicha composición farmacéutica se administra al individuo mediante infusión o inyección. La administración de las composiciones adecuadas pueden efectuarse por medios diferentes, por ejemplo, mediante administración intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, tópica o intradérmica.

La composición farmacéutica de la presente divulgación puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se conocen bien en la técnica ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados y estos incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos pueden formularse mediante procedimientos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse al sujeto a una dosis adecuada.

El régimen de dosificación será determinado por el médico a cargo y factores clínicos. Como se conoce en la técnica médica, las dosificaciones para un paciente cualquiera depende de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se vaya a administrar, el sexo, el momento y la vía de administración, el estado general de salud y otros fármacos que se estén administrando simultáneamente. Una dosificación preferida para administración podría estar en el intervalo de 0,24 µg a 48 mg, preferentemente de 0,24 µg a 24 mg, más preferentemente de 0,24 µg a 2,4 mg, aun más preferentemente de 0,24 µg a 1,2 mg y más preferentemente de 0,24 µg a 240 mg unidades por kilogramo de peso corporal por día. Se indican posteriormente en el presente documento dosificaciones particularmente preferidas. El progreso puede supervisarse por evaluación periódica. Se administran linfocitos T modificados por CAR mediante infusión intravenosa. Las dosis pueden variar de $1 \times 10^7/m^2$ a $2 \times 10^8/m^2$.

Las composiciones de la divulgación se pueden administrar por vía local o sistémica. La administración será en

general parenteral, por ejemplo, intravenosa; también puede administrarse ADN directamente al sitio diana, por ejemplo, mediante suministro biolístico a un sitio diana interno o externo o mediante catéter a un sitio en una arteria. En una realización preferida, la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea y en una realización aún más preferida por vía intravenosa. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reforzadores de fluidos y nutrientes, reforzadores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer), y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica de la presente divulgación podría comprender vehículos proteicos, como, por ejemplo, albúmina de suero o inmunoglobulina, preferentemente de origen humano. Se prevé que la composición farmacéutica de la divulgación podría comprender, además de las construcciones de CAR o moléculas de ácido nucleico o vectores que las codifican (como se describe en la presente divulgación), agentes biológicamente activos adicionales, dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica.

Cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento pueden estar comprendidas en un kit para tratar cáncer que expresan CD138. En un ejemplo no limitante, una o más células inmunitarias dirigidas a CD138 para su uso en terapia celular y/o los reactivos para generar una o más células para su uso en terapia celular que alberga vectores de expresión recombinante pueden estar comprendidas en un kit. Los componentes del kit se proporcionan en medios recipientes adecuados.

Algunos componentes de los kits pueden envasarse en medio acuoso o en forma liofilizada. Los medios recipientes de los kits incluirán en general al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa u otros medios recipientes, en los que puede colocarse un componente y, preferentemente, aplicarse en alícuotas. Cuando haya más de un componente en el kit, el kit también contendrá en general un segundo, tercer u otro recipiente adicional en el que pueden colocarse por separado los componentes adicionales. Sin embargo, diversas combinaciones de componentes pueden estar comprendidas en un vial. Los kits también incluirán típicamente un medio para contener los componentes en confinamiento estrecho para su venta comercial. Dichos recipientes pueden incluir recipientes de plástico moldeados por inyección o soplado en los que se conservan los viales deseados.

Cuando los componentes del kit se proporcionan en una o más soluciones líquidas, la solución líquida es una solución acuosa, siendo una solución acuosa estéril particularmente útil. En algunos casos, el medio recipiente puede ser en sí mismo una jeringa, pipeta y/u otro aparato similar, desde los que la formulación puede aplicarse a un área infectada del cuerpo, inyectarse en un animal y/o incluso aplicarse a y/o mezclarse con los otros componentes del kit.

Sin embargo, los componentes del kit pueden proporcionarse como polvo o polvos secos. Cuando se proporcionan reactivos y/o componentes como un polvo seco, el polvo puede reconstituirse mediante la adición de un disolvente adecuado. Se prevé que el disolvente también puede proporcionarse en otro medio recipiente. Los kits también pueden comprender un segundo medio recipiente para contener un tampón estéril, farmacéuticamente aceptable y/u otro diluyente.

En realizaciones particulares, las células que van a usarse para terapia celular se proporcionan en un kit y, en algunos casos, las células son esencialmente el único componente del kit. El kit puede comprender reactivos y materiales para preparar la célula deseada. En realizaciones específicas, los reactivos y materiales incluyen cebadores para amplificar las secuencias deseadas, nucleótidos, tampones adecuados o reactivos de tampón, sal, etc., y en algunos casos los reactivos incluyen vectores y/o ADN que codifica una molécula de interacción como se describe en el presente documento y/o elementos reguladores de los mismos.

En realizaciones particulares, hay uno o más aparatos en el kit adecuados para extraer una o más muestras de un individuo. El aparato puede ser una jeringa, un bisturí, etc.

En aspectos particulares, el kit comprende la terapia celular de la divulgación y también la quimioterapia para la que las células son inmunitarias. En algunos casos, el kit, además de las realizaciones de terapia celular, también incluye una segunda terapia de cáncer, tal como quimioterapia, terapia hormonal y/o inmunoterapia, por ejemplo. El kit o los kits pueden adaptarse a un cáncer particular para un individuo y comprenden segundas terapias de cáncer respectivas para el individuo.

XII. Usos terapéuticos de linfocitos T que expresan CD138 CAR

Como ilustración, los enfermos de cáncer o pacientes susceptibles al cáncer o que se sospecha que tienen cáncer pueden tratarse como se describe en el presente documento. Pueden administrarse células inmunitarias modificadas como se describen en el presente documento al individuo y conservarse durante periodos de tiempo prolongados. El

individuo puede recibir una o más administraciones de las células. En algunos aspectos, las células modificadas genéticamente se encapsulan para inhibir el reconocimiento inmunitario y se colocan en el sitio del tumor.

En diversas realizaciones las construcciones de expresión, secuencias de ácido nucleico, vectores, células hospedadoras y/o composiciones farmacéuticas que los comprenden se usan para la prevención, el tratamiento o el alivio de una enfermedad cancerosa, tal como una enfermedad tumoral. En realizaciones particulares, la composición farmacéutica de la presente divulgación puede ser particularmente útil en la prevención, el alivio y/o el tratamiento del cáncer, incluyendo cáncer que tiene tumores sólidos, por ejemplo.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" o "tratar" incluyen cualquier efecto beneficioso o deseable en los síntomas o patología de una enfermedad o afección patológica y pueden incluir incluso reducciones mínimas en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o afección que se trata, por ejemplo, cáncer. El tratamiento puede implicar opcionalmente la reducción o el alivio de síntomas de la enfermedad o afección, o el retardo de la progresión de la enfermedad o afección. El "tratamiento" no indica necesariamente erradicación completa o cura de la enfermedad o afección o síntomas asociados con los mismos.

Como se usa en el presente documento, "prevenir", y palabras similares tales como "prevenido", "prevención", etc., indican un enfoque para prevenir, inhibir o reducir la probabilidad de la aparición o reaparición de, una enfermedad o afección, por ejemplo, cáncer. También se refiere al retardo de la aparición o reaparición de una enfermedad o afección o retardo de la aparición o reaparición de los síntomas de una enfermedad o afección. Como se usa en el presente documento, "prevención" y palabras similares también incluyen reducir la intensidad, el efecto, los síntomas y/o la carga de una enfermedad o afección antes del comienzo o reaparición de la enfermedad o afección.

En realizaciones particulares, la presente invención contempla, en parte, células que albergan construcciones de expresión, moléculas de ácido nucleico y/o vectores que pueden administrarse solos o en cualquier combinación con otra terapia y en al menos algunos aspectos, junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, antes de la administración de las células, dichas moléculas de ácido nucleico o vectores pueden integrarse de forma estable en el genoma de las células. En realizaciones específicas, pueden usarse vectores víricos que son específicos para determinadas células o tejidos y persisten en dichas células. Se conocen bien en la técnica vehículos y excipientes farmacéuticos adecuados. Las composiciones preparadas según la divulgación pueden usarse para la prevención o el tratamiento o retardo de las enfermedades identificadas anteriormente.

Además, la divulgación se refiere a un método para la prevención, el tratamiento o el alivio de una enfermedad cancerosa (incluyendo tumoral) que comprende la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite de una cantidad eficaz de células que albergan una molécula de resto de reconocimiento de antígenos y una molécula de resistencia a quimioterapia, secuencia de ácido nucleico que las codifica, vector o vectores que las codifican, como se contempla en el presente documento y/o producidos por un proceso como se contempla en el presente documento.

Son posibles indicaciones para administración de la composición o las composiciones de las células inmunitarias modificadas ejemplares enfermedades cancerosas, incluyendo enfermedades tumorales, incluyendo cánceres de mama, próstata, pulmón y colon o cánceres/carcinomas epiteliales tales como MM, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cánceres del tracto genitourinario, por ejemplo, cáncer ovárico, cáncer endometrial, cáncer del cuello uterino y cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer del intestino delgado, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de vesícula biliar, cáncer del conducto biliar, cáncer de esófago, cáncer de las glándulas salivales y cáncer de la glándula tiroidea. Son ejemplos de indicaciones para administración de la composición o las composiciones de células enfermedades cancerosas, incluyendo cualquier neoplasia maligna que exprese CD138, por ejemplo. Además, incluye neoplasias malignas que expresen de forma aberrante otros antígenos tumorales y esos también pueden ser diana. La administración de la composición o las composiciones de la divulgación es útil para todos los estadios y tipos de cáncer, incluyendo para enfermedad residual mínima, cáncer temprano, cáncer avanzado y/o cáncer metastásico y/o cáncer refractario, por ejemplo.

La divulgación abarca además protocolos de coadministración con otros compuestos, por ejemplo construcciones de anticuerpos biespecíficos, toxinas dirigidas u otros compuestos, que actúan mediante células inmunitarias. El régimen clínico para coadministración del compuesto o los compuestos de la invención puede abarcar coadministración al mismo tiempo, antes y/o después de la administración del otro componente. Las terapias de combinación particulares incluyen quimioterapia, radiación, cirugía, terapia hormonal u otros tipos de inmunoterapia.

Las realizaciones se refieren a un kit que comprende una o más células inmunitarias como se describe en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico como se describe en el presente documento, un vector como se describe en el presente documento y/o un hospedador como se describe en el presente documento. También se contempla que el kit de la presente divulgación comprende una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente en el presente documento, sola o en combinación con medicamentos adicionales para administrar a un individuo que necesite tratamiento o intervención médicos.

Los CTL que se han modificado con las construcciones se dejan crecer después en cultivo en condiciones selectivas y las células que se seleccionan por tener la construcción pueden después expandirse y analizarse adicionalmente, utilizando, por ejemplo; la reacción en cadena de la polimerasa para determinar la presencia de la construcción o las construcciones en las células hospedadoras. Una vez que las células hospedadoras modificadas se han identificado, estas pueden usarse como se había planeado, por ejemplo, expandirse en cultivo o introducirse en un organismo hospedador.

Dependiendo de la naturaleza de las células, las células pueden introducirse en un organismo hospedador, por ejemplo, un mamífero, en una amplia diversidad de maneras. Las células pueden introducirse en el sitio del tumor, en realizaciones específicas, aunque en realizaciones alternativas las células se dirigen al cáncer o se modifican para dirigirse al cáncer. El número de células que se emplean dependerá de varias circunstancias, el fin de la introducción, el tiempo de vida de las células, el protocolo que se va a emplear, por ejemplo, el número de administraciones, la capacidad de las células para multiplicarse, la estabilidad de la construcción recombinante y similares. Las células pueden aplicarse como una dispersión, inyectándose en general en o cerca del sitio de interés. Las células pueden estar en un medio fisiológicamente aceptable.

No es necesario que la introducción de ADN dé como resultado la integración en todos los casos. En algunas situaciones, el mantenimiento transitorio del ADN introducido puede ser suficiente. De este modo, se podría tener un efecto a corto plazo, en el que las células podrían introducirse en el hospedador y después activarse después de un tiempo predeterminado, por ejemplo, después de que las células hayan sido capaces de dirigirse a un sitio particular.

Las células pueden administrarse según se desee. Dependiendo de la respuesta deseada, la forma de administración, la vida de las células, el número de células presentes, pueden emplearse diversos protocolos. El número de administraciones dependerá de los factores descritos anteriormente al menos en parte.

Debería apreciarse que el sistema está sujeto a muchas variables, tales como la respuesta celular al ligando, la eficacia de expresión y, según sea apropiado, el nivel de secreción, la actividad del producto de expresión, la necesidad particular del paciente, que puede variar según el tiempo y las circunstancias, la tasa de pérdida de la actividad celular como resultado de la pérdida de células o actividad de expresión en células individuales, y similares. Por lo tanto, se espera que para cada paciente individual, incluso si hubiera células universales que pudieran administrarse a la población en general, cada paciente se supervisaría con respecto a la dosificación apropiada para el individuo, y dichas prácticas de supervisión de un paciente son rutinarias en la técnica.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la divulgación. Los expertos en la materia deberían apreciar que las técnicas desveladas en los ejemplos a continuación representan técnicas que el inventor ha descubierto que actúan bien en la práctica de la divulgación y por lo tanto puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente divulgación, apreciar que pueden realizarse muchos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan y obtener aún un resultado parecido o similar sin alejarse del alcance de la divulgación.

EJEMPLO 1

ESTUDIOS INICIALES

XII. Estudios iniciales/datos preliminares

Se han desarrollado ensayos clínicos que se dirigen a CD19, la cadena ligera k de inmunoglobulinas humanas y CD30 en linfomas usando tecnología basada en CAR. Las estrategias están bajo investigación clínica y han indicado recientemente el primer grupo de pacientes tratados con CAR.CD19. En realizaciones de la presente divulgación, se usa tecnología de CAR para dirigirse a un trastorno hematológico ejemplar que no se ha seleccionado aún para su tratamiento por este enfoque.

Los linfocitos T redirigidos a CAR.CD138 se dirigen a CP malignas CD138+. Los inventores clonaron una cadena individual (scFv) específica de CD138 en fase con las regiones bisagra-CH2CH3 de IgG1, endodominio de CD28 y cadena ζ (CAR de 2ª generación) como se ha descrito previamente. La FIG. 1 ilustra la expresión del CAR.CD138 en linfocitos T activados y su destrucción específica de líneas celulares MM CD138+ (U266 y RPMI) y CP neoplasias primarias.

Los linfocitos T CAR.CD138+ controlan el crecimiento de MM *in vivo*. Para evaluar los efectos antitumorales de linfocitos T redirigidos a CAR *in vivo*, los inventores han establecido un modelo de xenoinjerto en ratones SCID y usaron un sistema de bioluminiscencia para seguir el crecimiento de MM. Para estos experimentos, se inyectaron a los ratones por vía intravenosa (i.v.) células U266 marcadas con luciferasa de luciérnaga (FFLuc) ($0,5 \times 10^6$ células). Cuando las células tumorales fueron uniformemente detectables por luminiscencia, se inyectó a ratones i.v. linfocitos T CAR+ y de control (10^7 células/ratón) sin citocinas exógenas. Como se muestra en la FIG. 2, los linfocitos T CAR+

proporcionan control del crecimiento de MM.

Expresión inducible por hipoxia de CAR.CD138. Para generar el CAR.CD138 inducible por hipoxia, los inventores invirtieron la orientación del casete de CAR.CD138 en la cadena principal retrovímica de SFG e incluyeron las 6 repeticiones del HRE fusionado con un promotor de CMV mínimo (Clontech) en su extremo 3'. La FIG. 3 ilustra la expresión y función del CAR.CD138 (hCAR.CD138) inducible por hipoxia en linfocitos T activados en normoxia e hipoxia (tensión de O₂ 1 %).

En general estos estudios iniciales indican la practicidad de la divulgación. Es importante destacar que, el CAR.CD138 expresado bajo el control de HRE conserva función anti MM completa.

EJEMPLO 2

MÉTODOS EJEMPLARES

Varios métodos usados habitualmente se describen completamente en publicaciones previas (9, 25).

En realizaciones de la divulgación, se aprovecha la naturaleza hipóxica del microambiente de MO de MM expresando el CAR.CD138 bajo el control inducible de elementos sensibles a hipoxia (HRE). Se pueden definir también los elementos inmunitarios más ventajosos para coestimulación de linfocitos T de CAR en un ambiente hipóxico tanto *in vitro* como *in vivo* en un modelo de ratón xenogénico. Finalmente, para aumentar adicionalmente la seguridad del enfoque propuesto, el experto en la materia puede incorporar en la construcción un gen suicida previamente validado basado en caspasa inducible 9 (iC9).

Los estudios iniciales (FIG. 1 y 2) indican claramente que linfocitos T que expresan de forma constitutiva CAR.CD138 tienen efectos anti MM tanto *in vitro* como *in vivo* en modelo de ratón de xenotrasplante. Como se muestra en la FIG. 3, hCAR.CD138 está regulado de forma positiva significativamente cuando los linfocitos T se exponen a hipoxia, y estas células conservan actividad anti MM. El CAR.CD138 en estos estudios codifica el endodominio coestimulante de CD28. Se pueden comparar *in vitro* los efectos de endodominios coestimulantes, incluyendo 4-1BB y su combinación en hipoxia. Se puede medir la proliferación *in vitro*, liberación de citocinas y actividad citotóxica después de estimulación de antígenos en serie y actividad antitumoral *in vivo* en un modelo de ratón (FIG. 2). Además, debido a que aún se observa expresión de CAR escasa incluso en normoxia (FIG. 3), puede incluirse un aislante entre el HRE y el LTR del extremo 3' para reducir adicionalmente la expresión. Tras la expresión funcional del hCAR.CD138 en hipoxia de la MO, los linfocitos T con capacidad de autorrenovación pueden escapar del ambiente de la MO y volver a circular, creando toxicidad potencial. Debido a que se tardan 48-72 horas en que los linfocitos T regulen negativamente la expresión de CAR cuando se transfieren de hipoxia a normoxia (al menos en algunas realizaciones), se puede coexpresar un gen suicida basándose en la caspasa 9 inducible (iC9), bajo un promotor constitutivo de modo que puedan eliminarse rápidamente si provocan toxicidad. El gen de iC9 puede acomodarse en el vector retrovímico descrito en la FIG. 3 en orientación opuesta bajo el control constitutivo del LTR 5'. Se evalúa la funcionalidad del vector *in vitro* e *in vivo*.

En realizaciones de la divulgación, un vector útil permite la expresión predominante y funcional del CAR.CD138 en hipoxia tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, se anticipa que la inclusión del gen suicida elimina las células en caso de toxicidad. Si la expresión de CAR en hipoxia es funcionalmente insuficiente, se puede atribuir eso al tamaño del casete que incluye el aislante (tamaño total de 3,5 kb) y puede transferir el casete en un vector lentivímico que ha aumentado la capacidad de carga, en comparación con vectores retrovímicos. Puede emplearse un enfoque retrovímico debido a que la fabricación de estos vectores es robusta y altamente reproducible, aunque en algunos casos se utiliza lentivirus.

En una realización de la divulgación, hay un método que abarca fabricar el vector retrovímico de uso clínico y líneas de linfocitos T modificadas por CAR de enfermos de MM e infundirlas en pacientes con MM recidivante. El experto en la materia puede evaluar la seguridad del procedimiento y si se produce toxicidad, se puede administrar el fármaco dimerizador para activar el gen de seguridad de iC9 *in vivo*. Se puede evaluar también si las infusiones de linfocitos T proporcionan control de enfermedad en pacientes con enfermedad detectable.

Se produce una línea celular productora retrovímica estable que codifica hCAR.CD138 e iC9 constitutivo. Como se ha descrito previamente, puede emplearse empaquetamiento de PG13. Los procedimientos detallados para preparar la línea celular productora se proporcionan en la descripción principal. El sobrenadante de uso clínico obtenido de este empaquetamiento puede usarse para transducir linfocitos T de muestras de SP obtenidas de enfermos de MM.

Se pueden evaluar los efectos del aumento de dosis de linfocitos T que expresan el hCAR.CD138 e iC9 en pacientes con MM recidivante/refractario (en contraste con otras realizaciones, en las que se pueden tratar pacientes sensibles a terapias de primera línea convencionales). Se puede evaluar inicialmente una única dosis intravenosa de linfocitos T CAR a tres niveles de dosis diferentes. Se administran linfocitos T después del tratamiento con bendamustina debido a que este fármaco tiene algo de actividad anti MM y probablemente cree un ambiente favorable para la expansión de linfocitos T CAR transferidos de forma adoptiva.

Puede desarrollarse una línea productora estable con un título > 10⁶ por ml. La eficacia de transducción de linfocitos T puede variar del 30 % al 40 % en hipoxia (FIG. 3). Los linfocitos T redirigidos pueden eliminar dianas CD138+ en experimentos de cocultivo en hipoxia y pueden eliminarse rápidamente (>90 % de células transducidas) en un periodo de 24 h de exposición *in vitro* a AP1903 (20-50 nM), el dimerizador de molécula pequeña que activa el gen suicida de iC9.

En realizaciones de la divulgación, el destino de los linfocitos T CAR infundidos se caracteriza midiendo su supervivencia *in vivo* y pueden determinarse los efectos posteriores del fármaco dimerizador en estas células *in vitro* e *in vivo*. También se puede comparar la acumulación de estas células en la MO y sangre periférica, la expresión diferencial del CAR por linfocitos T en cada ambiente, y su capacidad relacionada para destruir células tumorales.

Se estima la persistencia y expansión de linfocitos T transferidos usando inmunofenotipo y ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR) en ADN extraído de SP recogida en diferentes puntos temporales después de infusiones de linfocitos T. Se recogen muestras de MO en la semana 6 como parte de la evaluación clínica de estos pacientes. Se recogen muestras de plasma y se congelan instantáneamente a intervalos para detectar IL-2, IL6, IFN γ y TNF α liberados por linfocitos T *in vivo*. Se pueden buscar también pruebas clínicas de actividad antitumoral supervisando niveles de paraproteínas e infiltración de MO de CP a las 6, 12 y 24 semanas, por ejemplo. Los pacientes se supervisan estrechamente con respecto a la aparición de toxicidad según criterios del NCI. En el caso de toxicidad de grado III-IV, los pacientes se tratan con AP1903 para activar el gen de iC9 como se ha indicado previamente. Los efectos de iC9 se cuantifican midiendo la pérdida de células en circulación CAR+ y por cambios en el transgén de iC9 por QPCR.

La señal molecular del CAR (que es independiente de hipoxia) se detecta en muestras tanto de SP como de MO a la semana 6, incluso aunque puede haber mayor señal en la MO debido a la acumulación de linfocitos T CAR. Se anticipa que la expresión del CAR por citometría de flujo en linfocitos T (que depende de la hipoxia, ya que detecta síntesis de proteínas) es mucho mayor en MO en comparación con SP porque la MO MM es hipóxica. Si números iguales de linfocitos T son fenotípicamente CAR positivos tanto en SP como en MO, esto refleja la recirculación de linfocitos T activados por hipoxia sin la regulación negativa anticipada de CAR que se espera cuando las células vuelven a un ambiente normóxico, en realizaciones específicas. Se puede determinar si esta expresión continuada está asociada con toxicidad y, si lo está, se puede determinar si puede anularse por la administración de AP1903 que activa el gen suicida de iC9. La activación de iC9 puede eliminar >90 % de hCAR.CD138T en un periodo de 3 horas desde la administración de AP1903. Si los efectos secundarios continúan aumentando a pesar de la administración de AP1903 se pueden administrar dosis adicionales de fármaco y esteroides de alta dosis. En realizaciones específicas, la infusión de linfocitos T hCAR.CD138 produce reducción significativa de tumor. En el caso de que una única dosis de linfocitos T sea insuficiente para inducir remisión completa, se pueden administrar dosis adicionales de linfocitos T.

En realizaciones específicas, el CAR.CD138 se injerta en terceros CTL específicos de VEB, para preparar productos "disponibles para la venta" para enfermos de MM, un enfoque de valor particular después de los trasplantes de células madre alogénicas no mieloablativas que pueden usarse para enfermos de MM mayores con enfermedad grave. En algunas realizaciones hay dirección de otros antígenos asociados a tumor (MAGE, PRAME, Survivina) usando TCR dirigidos a AAT MM. La inclusión de una tercera especificidad mediada por un CAR en lugar de un TCR puede reducir significativamente el escape tumoral debido a la pérdida de antígenos o procesamiento de antígenos/expresión de moléculas del HLA, en algunas realizaciones. Se puede expresar el scFv CD138 como una proteína "de interacción" secretable.

EJEMPLO 3

ESTUDIO DE LINFOCITOS T QUE EXPRESAN CAR ESPECÍFICO DE CD138 PARA DISCRASIAS DE CÉLULAS PLASMÁTICAS AVANZADAS

En realizaciones de la divulgación, se puede evaluar la seguridad de dosis crecientes de linfocitos T de sangre periférica activados autólogos o singénicos (ATL) modificados genéticamente para expresar (a) un receptor de linfocitos T artificial (receptor de antígeno quimérico o CAR) que se dirige a la molécula de CD138 (CD138.CAR) bajo un promotor dependiente de hipoxia y (b) una proteína suicida caspasa 9 inducible (iC9) bajo un promotor activo de forma constitutiva. Las realizaciones específicas de métodos de la divulgación incluyen (1) medir la supervivencia y función de estos ATL CD138.CAR *in vivo*; (2) cuantificar los efectos antitumorales de ATL CD138.CAR en pacientes con discrasias de células plasmáticas refractarias, con respuestas clínicas evaluadas por los criterios de respuesta uniforme del grupo de trabajo de mieloma internacional (IMWG) modificados; y (3) evaluar la eficacia de la administración de AP1903, un dimerizador usado para activar el gen suicida, midiendo la desaparición de células positivas para transgén de sangre periférica, si se produjera toxicidad.

En al menos algunos casos para un estudio inicial, hay criterios de elegibilidad ejemplares para tratamiento de linfocitos T. (1) la discrasia de células plasmáticas refractaria/recidivante (o recién diagnosticada si los pacientes son incapaces de recibir o completar la terapia convencional); (2) esperanza de vida de al menos 12 semanas; (3) función orgánica adecuada; (4) linfocitos T de sangre periférica transducidos autólogos disponibles con >20 % de

expresión de CD138.CAR/iC9 determinado por citometría de flujo; (5) consentimiento informado firmado; (6) sin historial de reacciones de hipersensibilidad a productos que contienen proteínas murinas.

Ejemplo de plan de tratamiento. Administración de bendamustina. Los pacientes reciben bendamustina (45 mg/m² diariamente durante 2 días, por ejemplo) para generar el linfoagotamiento y favorecer el injerto de los linfocitos T CAR⁺ infundidos.

La bendamustina también puede tener efectos antimieloma limitados. Administración de linfocitos T. Los linfocitos T se infunden el día 4-7 después del tratamiento con bendamustina para maximizar su exposición al medio de desarrollo de citocinas regenerativas incluyendo IL-7 e IL-15. Se evalúan tres niveles de dosis usando el método de reevaluación continua modificado y se incluyen cohortes de tamaño dos a cada nivel de dosis. Cada paciente recibe una inyección según el siguiente plan de dosificación: Grupo 1, 2x10⁷ células/m²; Grupo 2, 1x10⁸ células/m²; Grupo 3, 2x10⁸ células/m². En ausencia de toxicidad directa, se puede obtener permiso para administrar dosis secuenciales de linfocitos T, una estrategia seguida en estudios previos ejemplares.

Supervisión de parámetros clínicos y biológicos. Se pueden supervisar determinados parámetros e incluyen un historial y examen físico e investigaciones de laboratorio rutinarias realizadas antes y a las 4 horas y 1, 2, 4, 6 semanas después de infusión de linfocitos T. También se puede supervisar la persistencia de linfocitos T CAR⁺ por un ensayo de Q-PCR específico como se describe para otros estudios diseñados para detectar integrantes retrovíricos. Se realiza detección de retrovirus competentes para replicación (RCR) y de clonalidad integrante retrovírica según las directrices de la FDA. Se utiliza evaluación de la carga de enfermedad, incluyendo MO, antes y 6 semanas después del tratamiento.

Toxicidad de dosis limitante (TDL). La TDL puede definirse como cualquiera de los siguientes que puede considerarse posiblemente, probablemente o definitivamente relacionado con los linfocitos T modificados: (1) cualquier toxicidad no hematológica de Grado 3 o Grado 4; (2) cualquier TDL hematológica de Grado 4 (se esperan citopenias con bendamustina y no se clasificarán como TDL; los pacientes con implicación de médula ósea extensiva no son evaluables para TDL hematológica). Si se produjera TDL no hematológica, los pacientes se tratarán con una única dosis de fármaco dimerizador (0,4 mg/kg) y se estudiarán los efectos en linfocitos T de genes modificados en circulación. Si no se reduce la toxicidad en un periodo de 48 h, el protocolo permitirá hasta 3 dosis adicionales de fármaco dimerizador en combinación con esteroides (1 mg/kg diariamente de metilprednisolona).

Terminación del estudio. El ensayo puede terminar cuando se tratan un mínimo de 10 pacientes, con 6 pacientes acumulados a la dosis actual, si no hay DLT, o cuando la probabilidad predictiva de DLT es >20 %. Pueden acumularse un máximo de 18 pacientes. La toxicidad se evalúa usando criterios del NCI (CTCAE). Un periodo de 6 semanas constituye un ciclo de tratamiento y sirve como la base para evaluar con respecto a DLT, en realizaciones específicas.

EJEMPLO 4

LOS LINFOCITOS T CD138 CAR SON EFICACES *IN VITRO* E *IN VIVO*

Los presentes ejemplos ilustran mediante medidas *in vitro* e *in vivo* que los linfocitos T CAR específicos de CD138 son eficaces contra células tumorales.

La FIG. 4 demuestra que CAR.CD138 puede expresarse eficazmente y de forma estable en linfocitos T tanto de donantes sanos como de muestras de mieloma múltiple (MM). Tal como se muestra en la Fig. 4D, los linfocitos T tanto de control como transducidos de donantes sanos contenían una proporción equilibrada de linfocitos T CD3+CD8⁺ (57 %±26 % y 54 %±14 %) y linfocitos T CD3+CD4⁺ (35 %±17 % y 37 %±13 %), mientras que los linfocitos T de enfermos de MM tendían a contener más células CD8⁺ (80 %±10 %). Los linfocitos T transducidos de donantes sanos y enfermos de MM contenían una proporción de células de memoria y efectoras (CD45RO⁺: 82 %±16 % y 79 %±9 %, respectivamente; CD62L⁺=51 %±17 % y 42 %±14 %, respectivamente) compatible con el procedimiento de expansión *ex vivo*.

En la FIG. 5, los linfocitos T CAR.CD138⁺ se dirigen a líneas celulares tumorales CD138⁺. Los linfocitos T de donantes sanos que expresaban CAR.CD138 lisaron líneas celulares derivadas de MM CD138⁺ seleccionadas a una tasa significativamente mayor que linfocitos T de control en un ensayo de liberación de 51Cr convencional (FIGS. 5A, 5D). Se observó un patrón de destrucción similar cuando se generaron linfocitos T transducidos de enfermos de MM (FIG. 5B). Por el contrario, los linfocitos T CAR.CD138⁺ tuvieron actividad insignificante contra dianas CD138⁻ particulares (FIGS. 5A, 5B, 5D) o linfocitos T de control (FIG. 5C).

La FIG. 6 demuestra que los linfocitos T CAR.CD138⁺ eliminan células tumorales CD138⁺ en experimentos de cocultivo. Para evaluar la capacidad a largo plazo de CAR.CD138⁺ para eliminar células tumorales CD138⁺, se cocultivaron linfocitos T CAR⁺ o de control con células tumorales CD138⁺ o células tumorales CD138⁻ en ausencia de citocinas exógenas (FIG. 6A); se enumeraron células tumorales residuales después de 5-7 días mediante análisis de FACS. En presencia de linfocitos T CAR⁺ hubo eliminación completa de tumores CD138⁺, mientras que las células

tumorales crecieron excesivamente en cultivos con linfocitos T de control.

Los linfocitos T CAR.CD138⁺ muestran un perfil de Th1 en respuesta a células tumorales (FIG. 7). Para evaluar el perfil de citocinas de CAR.CD138⁺, se cocultivaron linfocitos T CAR⁺ o de control con células tumorales CD138⁺ o CD138⁻. Se recogieron sobrenadantes de cultivo después de 24 horas y se analizaron con respecto a la presencia de Th1 y citocinas de Th1 particulares.

Los linfocitos T CAR.CD138⁺ se dirigen a células madre cancerosas potenciales (FIG. 8). Para asegurar que el enfoque también se dirigiera a células madre cancerosas potenciales, se estudió la expresión de CD138 por células SP contenidas en las células tumorales RPMI-8266 y después se supervisó si este subconjunto también podía eliminarse eficazmente mediante linfocitos T CAR⁺. En cocultivos con linfocitos T de control, no solamente estaban aún presentes células RPMI-8266, sino que también estaba presente un promedio de 6 % de células SP (FIG. 8A, 8B). Por el contrario, en cultivos con linfocitos T CAR⁺, las células RPMI se redujeron significativamente y no fueron detectables células SP (FIG. 8A, 8B). Para confirmar adicionalmente esta capacidad, las células SP se clasificaron directamente de la línea celular RPMI y se cultivaron con linfocitos T de control o CAR⁺ (FIG. 8C). Las células clasificadas como células SP se eliminaron completamente solamente en presencia de linfocitos T transducidos.

La FIG. 9 muestra que los linfocitos T CAR.CD138⁺ se dirigen a células de mieloma primario. Los linfocitos T CAR⁺ generados de donantes sanos eliminaron con éxito células tumorales seleccionadas CD138 de enfermos de MM a diferencia de linfocitos T de control (<80 % de factor de reducción) (FIG. 9A). En la fig. 9B, los linfocitos T CAR⁺ autólogos de forma similar eliminaron células de MM primario en comparación con linfocitos T de control y el perfil de citocinas en estos experimentos fue coherente con Th1 (FIG. 9C).

La FIG. 10 demuestra que los linfocitos T CAR.CD138⁺ tienen actividad antitumoral *in vivo*. Ratones NSG recibieron administración intravenosa de 4×10^6 células OPM-2 marcadas con luciferasa de luciérnaga, seguido de 3 infusiones i.v. con infusiones de linfocitos T CAR.CD138⁺ (1×10^7). Se realizó captura de imágenes bioluminiscente (IBL) comenzando el día 23 para supervisar el crecimiento tumoral. La FIG. 10A muestra fotones promedio/s/cm²/sr por ratón, determinado mediante BLI, comparando ratones tratados con linfocitos T de control o linfocitos T CAR.CD138⁺. Sumario de 3 experimentos independientes. La FIG. 10B ilustra una curva de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones tratados con linfocitos T CAR.CD138⁺ o linfocitos T de control ($p < 0,01$).

En la FIG. 11, hay generación y función de CAR.CD138 (HRE.CAR.CD138) inducible por hipoxia. La FIG. 11A proporciona una representación esquemática del HRE.CAR.CD138 codificado en un vector retroviral. Se cocultivaron linfocitos T CAR.CD138⁺ o HRE.CAR.CD138⁺ de control, constitutivos con las dianas CD138⁺ en normoxia o hipoxia (FIG. 11B). Después de 4 días de cultivo, las células se recogieron y se tiñeron con CD3 y CD138 para evaluar el crecimiento de células tumorales. También se evaluó la expresión de CAR en linfocitos T. Los linfocitos T HRE.CAR.CD138⁺ eliminaron las células tumorales en condiciones hipóxicas. (FIG. 11C) Se cocultivaron linfocitos T CAR.CD138⁺ o HRE.CAR.CD138⁺ de control, constitutivos, con las dianas CD138⁺ en normoxia o hipoxia. Después de 4 días de cultivo, las células se recogieron, se tiñeron con CD3 y se midió la dilución de CFSE mediante citometría de flujo. Los linfocitos T HRE.CAR.CD138⁺ proliferaron en condiciones hipóxicas.

Aunque la presente invención y sus ventajas se han descrito en detalle, debería entenderse que pueden realizarse diversos cambios, sustituciones y alteraciones en el presente documento sin alejarse del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas. Además, no se pretende que el alcance de la presente solicitud se limite a las realizaciones particulares del proceso, la máquina, la fabricación, la composición de materia, los medios, los métodos y las etapas descritas en la memoria descriptiva. Como apreciará un experto habitual en la materia fácilmente a partir de la divulgación de la presente invención, los procesos, las máquinas, la fabricación, las composiciones de materia, los medios, los métodos o las etapas, existentes en la actualidad o que se desarrollen posteriormente que realicen sustancialmente la misma función o consigan sustancialmente el mismo resultado que las realizaciones correspondientes descritas en el presente documento pueden utilizarse según la presente invención. En consecuencia, se pretende que las reivindicaciones adjuntas incluyan en su alcance dichos procesos, máquinas, fabricación, composiciones de materia, medios, métodos o etapas.

REIVINDICACIONES

1. Un vector de expresión que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico de CD138 y uno o más elementos reguladores sensibles a hipoxia funcionalmente relacionados con el mismo.
2. El vector de la reivindicación 1, que comprende además una secuencia que codifica un gen suicida inducible.
3. Un vector de expresión que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico de CD138 y que comprende lo siguiente:
 - a) uno o más elementos reguladores sensibles a hipoxia que están funcionalmente relacionados con el CAR específico de CD138; y/o
 - b) un gen suicida inducible.
4. El vector de la reivindicación 1 o 3, en el que:
 - (i) el vector es un vector no vírico o un vector vírico;
 - (ii) el vector es un vector retrovírico, vector lentivírico, vector adenovírico o vector vírico adenoasociado;
 - (iii) el CAR específico de CD138 comprende una región bisagra de IgG1; o
 - (iv) el CAR específico de CD138 comprende un dominio de señalización intracelular seleccionado del grupo que consiste en CD28, OX40, 4-1BB, ICOS y una combinación de los mismos.
5. El vector de la reivindicación 2 o 3, en el que el gen suicida se selecciona entre el grupo que consiste en caspasa 9, virus del herpes simple, timidina quinasa (VHS-tk), citosina desaminasa (CD) y citocromo P450.
6. El vector de la reivindicación 1 o 2, en el que el elemento regulador sensible a hipoxia comprende un elemento regulador sensible a hipoxia de VEGF, un elemento regulador sensible a hipoxia del receptor α 1B-adrenérgico, elemento regulador sensible a hipoxia de ácido graso sintasa, o una combinación de los mismos.
7. Una célula que comprende el vector de la reivindicación 1, 2 o 3, opcionalmente definida además como:
 - (i) una célula eucariota;
 - (ii) una célula humana;
 - (iii) autóloga, singénica, alogénica o xenogénica en relación con un individuo particular; o
 - (iv) un linfocito T citotóxico (CTL), linfocito citolítico natural o linfocito T citolítico natural.
8. La célula de la reivindicación 7, definida además como autóloga, singénica, alogénica o xenogénica en relación con un individuo particular y en la que el individuo:
 - (i) necesita tratamiento de cáncer;
 - (ii) necesita tratamiento para neoplasias malignas hematológicas de linaje B; o
 - (iii) necesita tratamiento para mieloma múltiple.
9. La célula de la reivindicación 7, definida además como un linfocito T citotóxico (CTL), linfocito citolítico natural o linfocito T citolítico natural, y en la que:
 - (i) la célula es específica de virus, opcionalmente en la que el virus es VEB, CMV, adenovirus, virus BK, VHH6, VRS, gripal, paragripal, bocavirus, coronavirus, LCMV, de paperas, de sarampión, metaneumovirus, parvovirus B, rotavirus, virus del Nilo Occidental, JC, VHH7 o VIH;
 - (ii) la célula comprende al menos otro CAR específico para un antígeno distinto de CD138, opcionalmente en el que el CAR es específico para un antígeno seleccionado del grupo que consiste en antígeno asociado a melanoma (MAGE), antígeno de melanoma expresado de forma preferente (PRAME), survivina, CD19, CD20, CD22, cadena ligera k, CD30, CD33, CD123, CD38, ROR1, ErbB2, ErbB3/4, dímeros de ErbB, EGFr vIII, antígeno carcinoembrionario, EGP2, EGP40, mesotelina, TAG72, PSMA, ligandos de NKG2D, B7-H6, receptor de IL-13 α 2, MUC1, MUC16, CA9, GD2, GD3, HMW-MAA, CD171, Lewis Y, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, receptor de folato α , CD44v6, CD44v7/8, integrina $\alpha_v\beta_6$, 8H9, NCAM, receptores de VEGF, 5T4, AchR fetal, ligandos de NKG2D, CD44v6, antígeno doble y universal; o
 - (iii) la célula expresa una proteína de interacción secretable, comprendiendo dicha proteína un dominio de activación y un dominio de reconocimiento de antígenos.
10. La célula de la reivindicación 9, en la que la célula expresa una proteína de interacción secretable, comprendiendo dicha proteína un dominio de activación y un dominio de reconocimiento de antígenos, y en el que:
 - (i) el dominio de activación, dominio de reconocimiento de antígenos, o ambos dominios comprenden restos de anticuerpos variables de fragmentos monocatenarios (scFV);
 - (ii) el dominio de activación es un scFV que reconoce una molécula seleccionada del grupo que consiste en CD3,

CD16, CD28, CD40, CD134 y CD137; o

(iii) el dominio de reconocimiento de antígenos se une con CD138.

5 11. Un vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un individuo.

12. Un kit que comprende un vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una célula de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10.

10 13. Un vector de expresión que codifica un CAR específico de antígeno tumoral y uno o más elementos reguladores sensibles a hipoxia funcionalmente relacionados con el mismo, en el que el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en antígeno asociado a melanoma (MAGE), antígeno de melanoma expresado de forma preferente (PRAME), survivina, CD19, CD20, CD22, cadena ligera k, CD30, CD33, CD123, CD38, ROR1, ErbB2, ErbB3/4, dímeros de ErbB, EGFr VIII, antígeno carcinoembrionario, EGP2, EGP40, mesotelina, TAG72, PSMA, ligandos de NKG2D, B7-H6, receptor de IL-13 a2, MUC1, MUC16, CA9, GD2, GD3, HMW-MAA, CD171, Lewis Y, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, receptor de folato a, CD44v6, CD44v7/8, integrina $\alpha_v\beta_6$, 8H9, NCAM, receptores de VEGF, 5T4, AchR fetal, ligandos de NKG2D, CD44v6, antígeno doble y universal.

20 14. El vector de expresión de la reivindicación 13, que comprende además una secuencia que codifica un gen suicida inducible.

15. Un vector de expresión que codifica un CAR específico de antígeno tumoral y que comprende lo siguiente:

25 a) uno o más elementos reguladores sensibles a hipoxia que están funcionalmente relacionados con el CAR específico de antígeno tumoral; y/o
b) un gen suicida inducible;

30 en el que el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en antígeno asociado a melanoma (MAGE), antígeno de melanoma expresado de forma preferente (PRAME), survivina, CD19, CD20, CD22, cadena ligera k, CD30, CD33, CD123, CD38, ROR1, ErbB2, ErbB3/4, dímeros de ErbB, EGFr VIII, antígeno carcinoembrionario, EGP2, EGP40, mesotelina, TAG72, PSMA, ligandos de NKG2D, B7-H6, receptor de IL-13 a2, MUC1, MUC16, CA9, GD2, GD3, HMW-MAA, CD171, Lewis Y, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, receptor de folato a, CD44v6, CD44v7/8, integrina $\alpha_v\beta_6$, 8H9, NCAM, receptores de VEGF, 5T4, AchR fetal, ligandos de NKG2D, CD44v6, antígeno doble y universal.

35



FIG. 1a

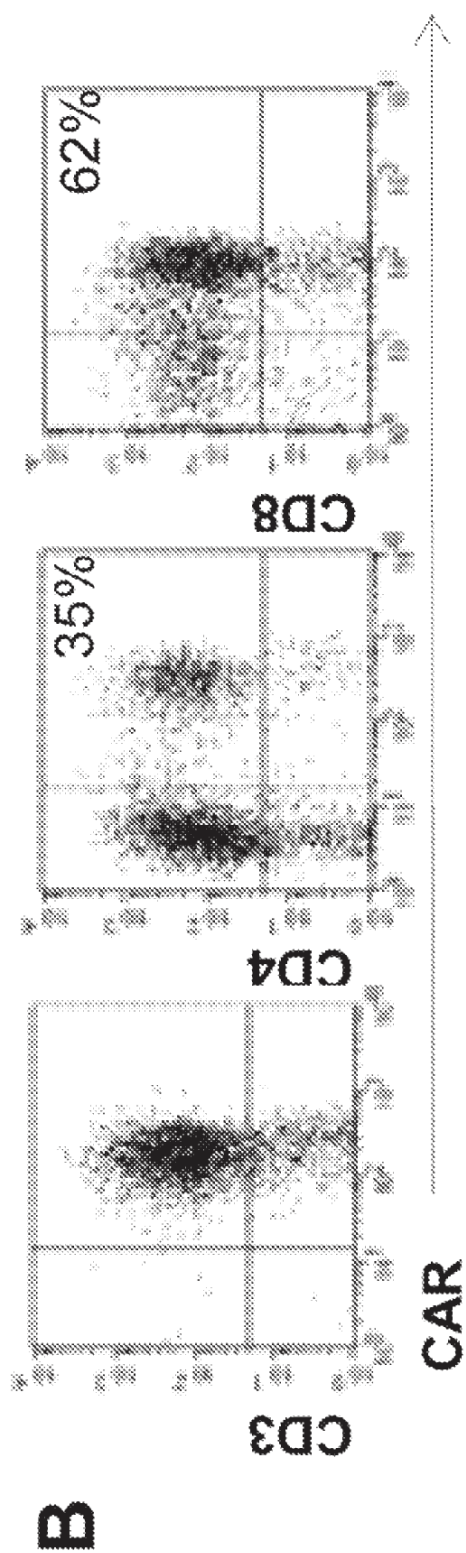
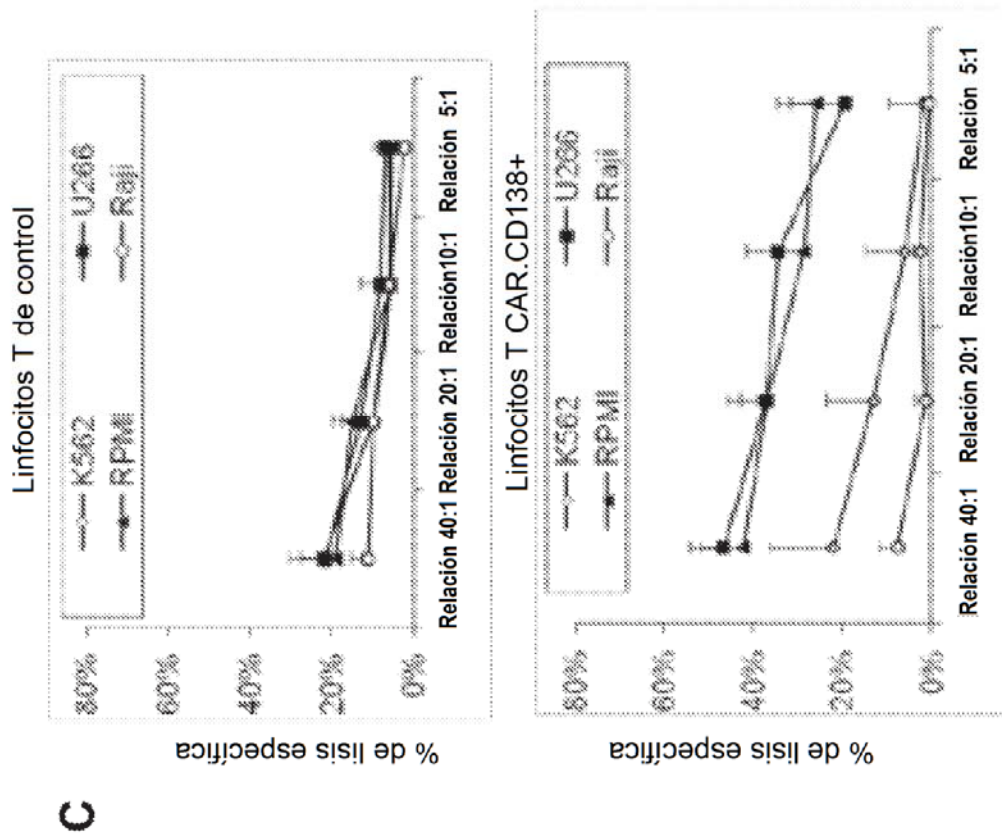


FIG. 1b



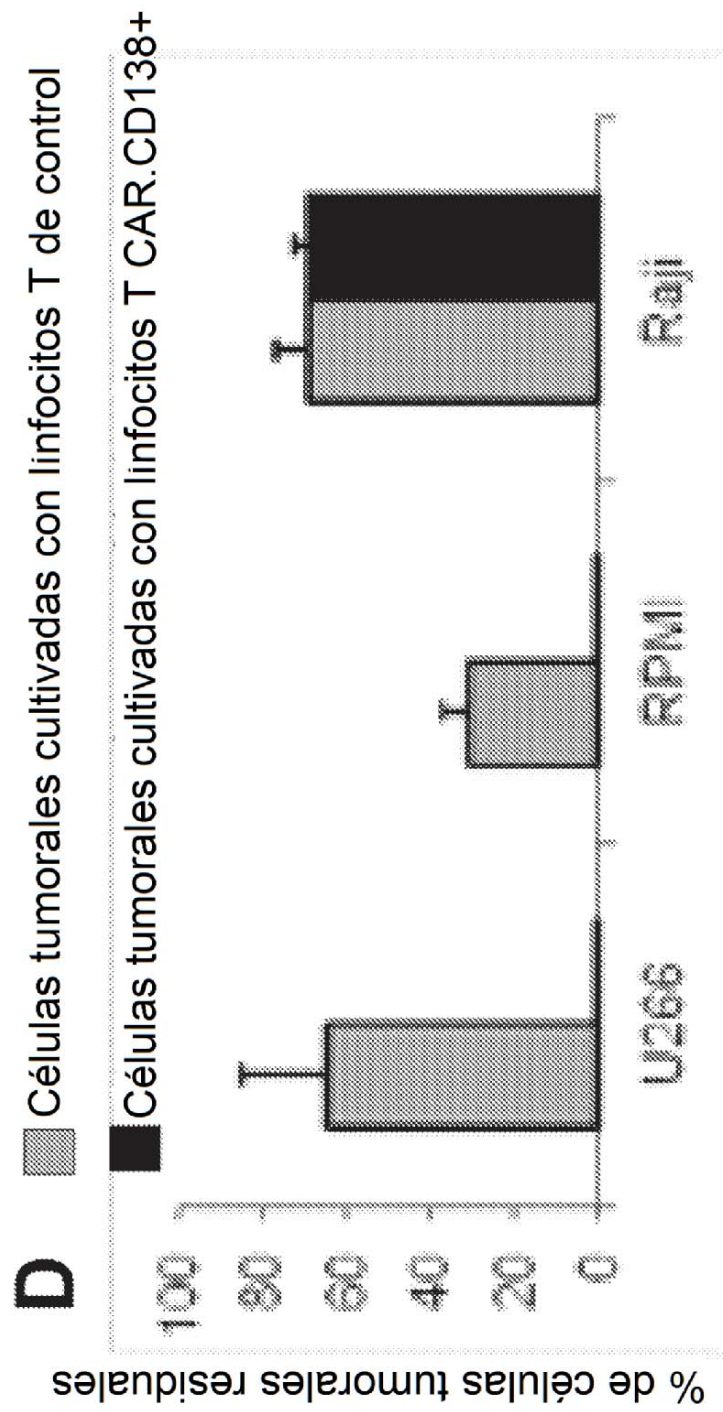


FIG. 1d

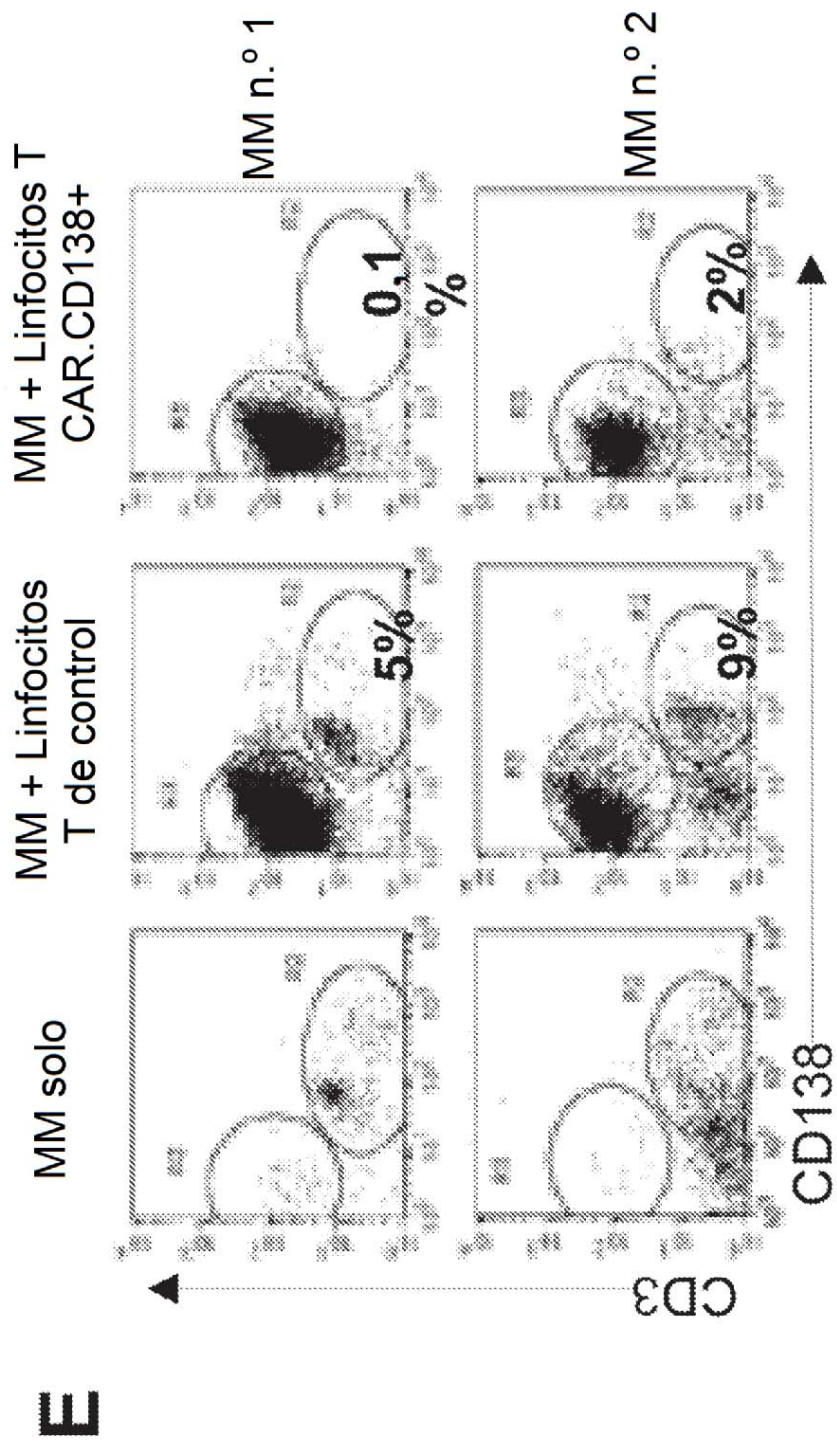


FIG. 1e

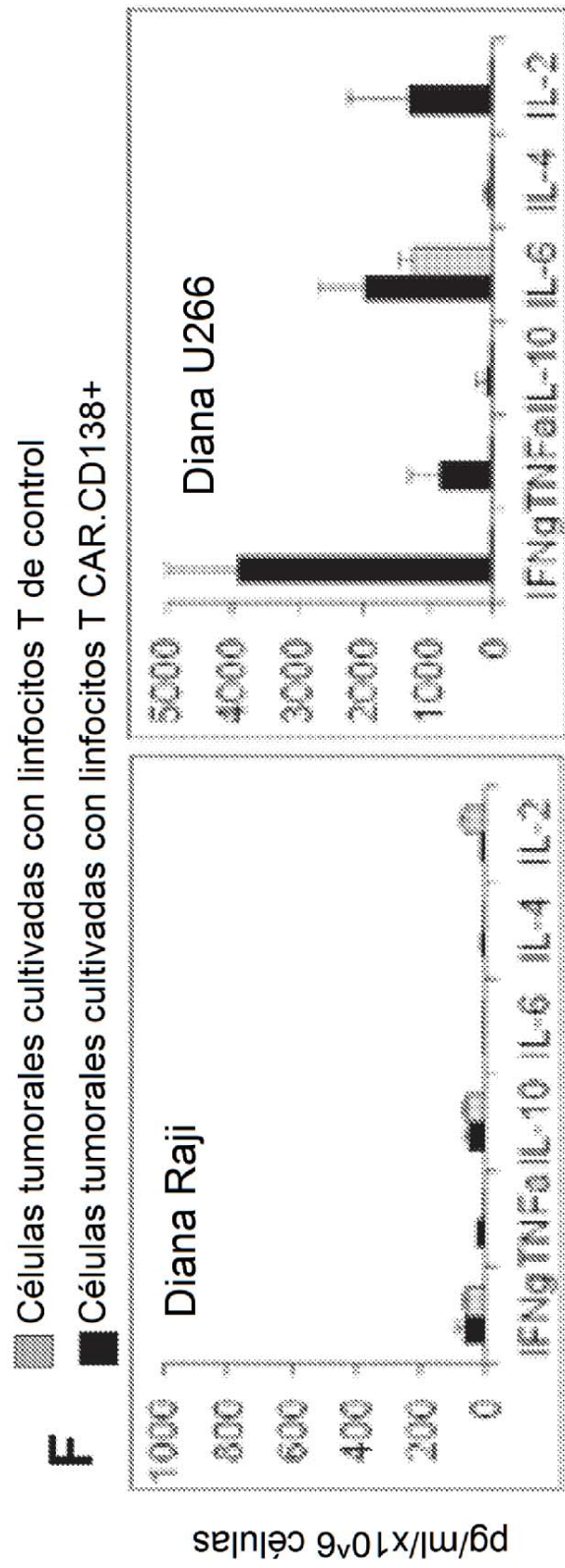


FIG. 1f

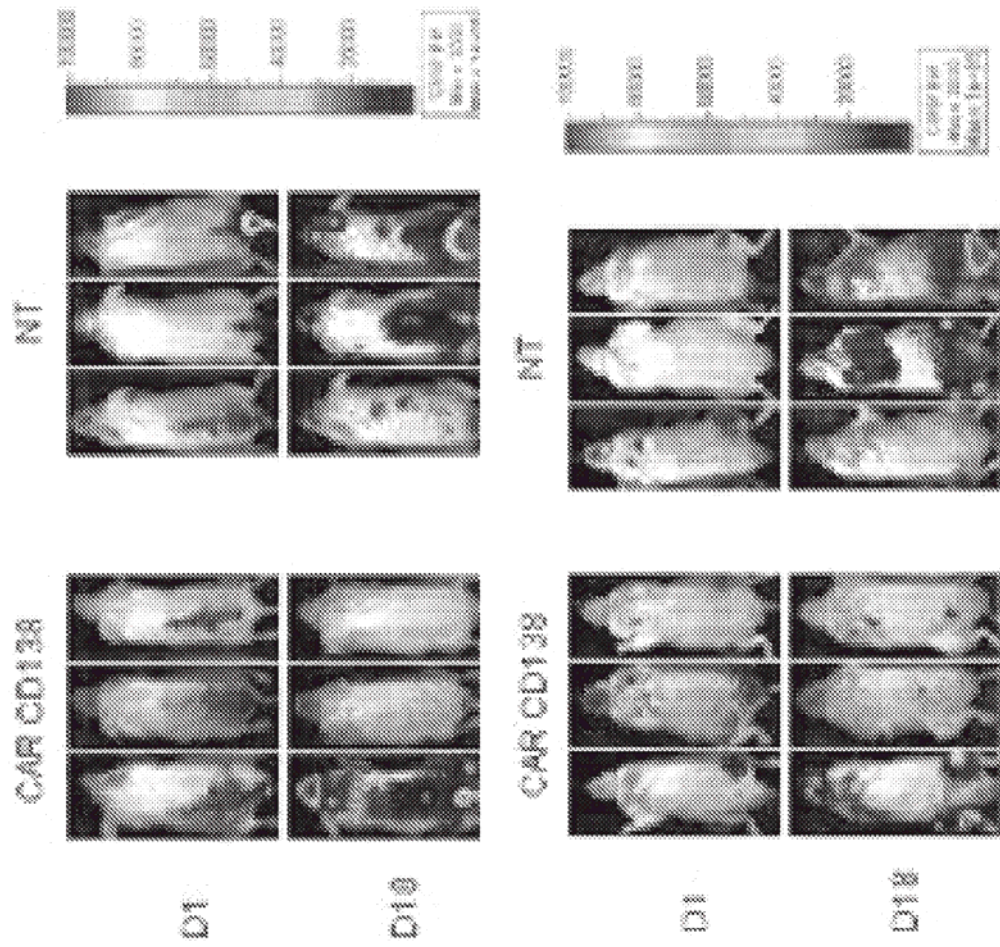


FIG. 2a

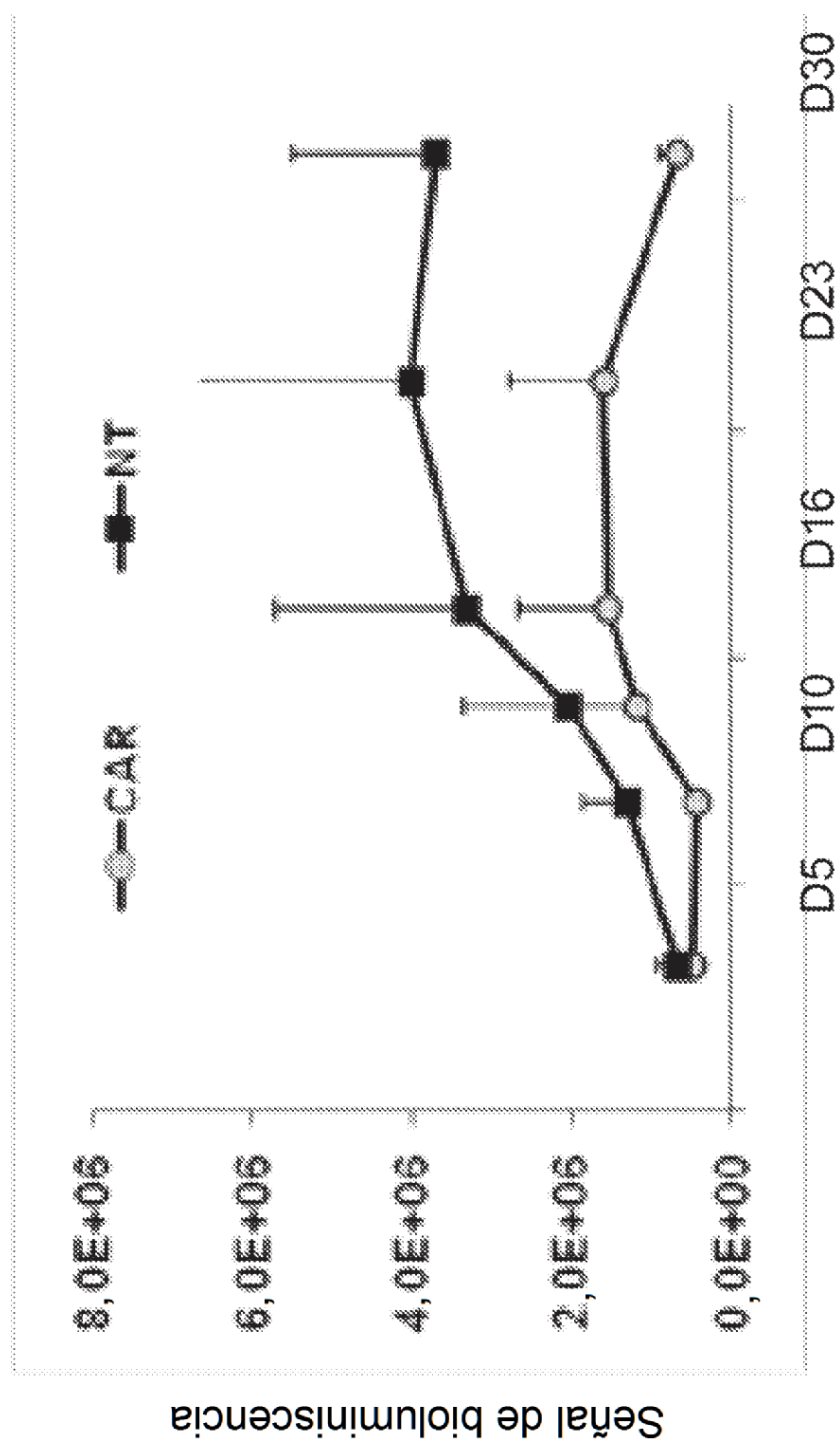


FIG. 2b



FIG. 3a

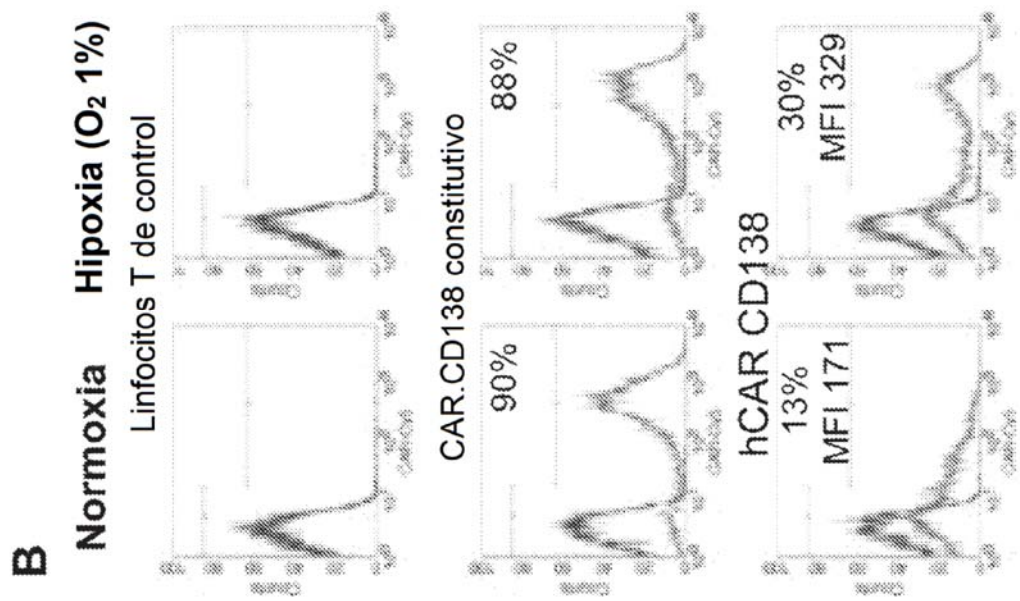
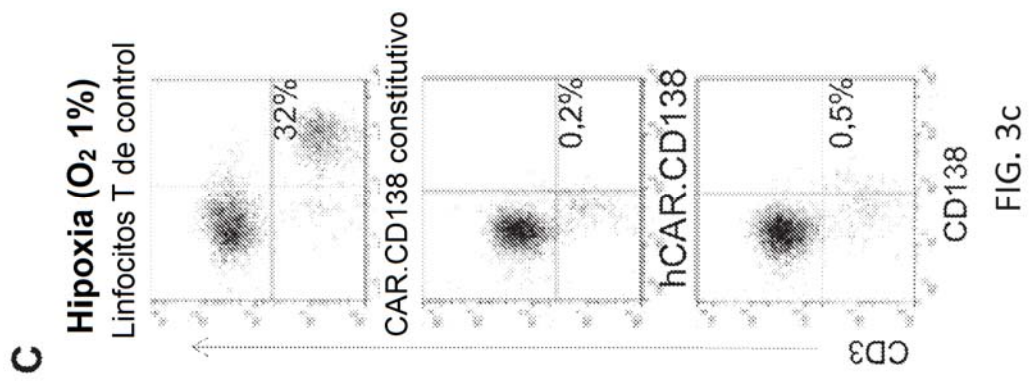
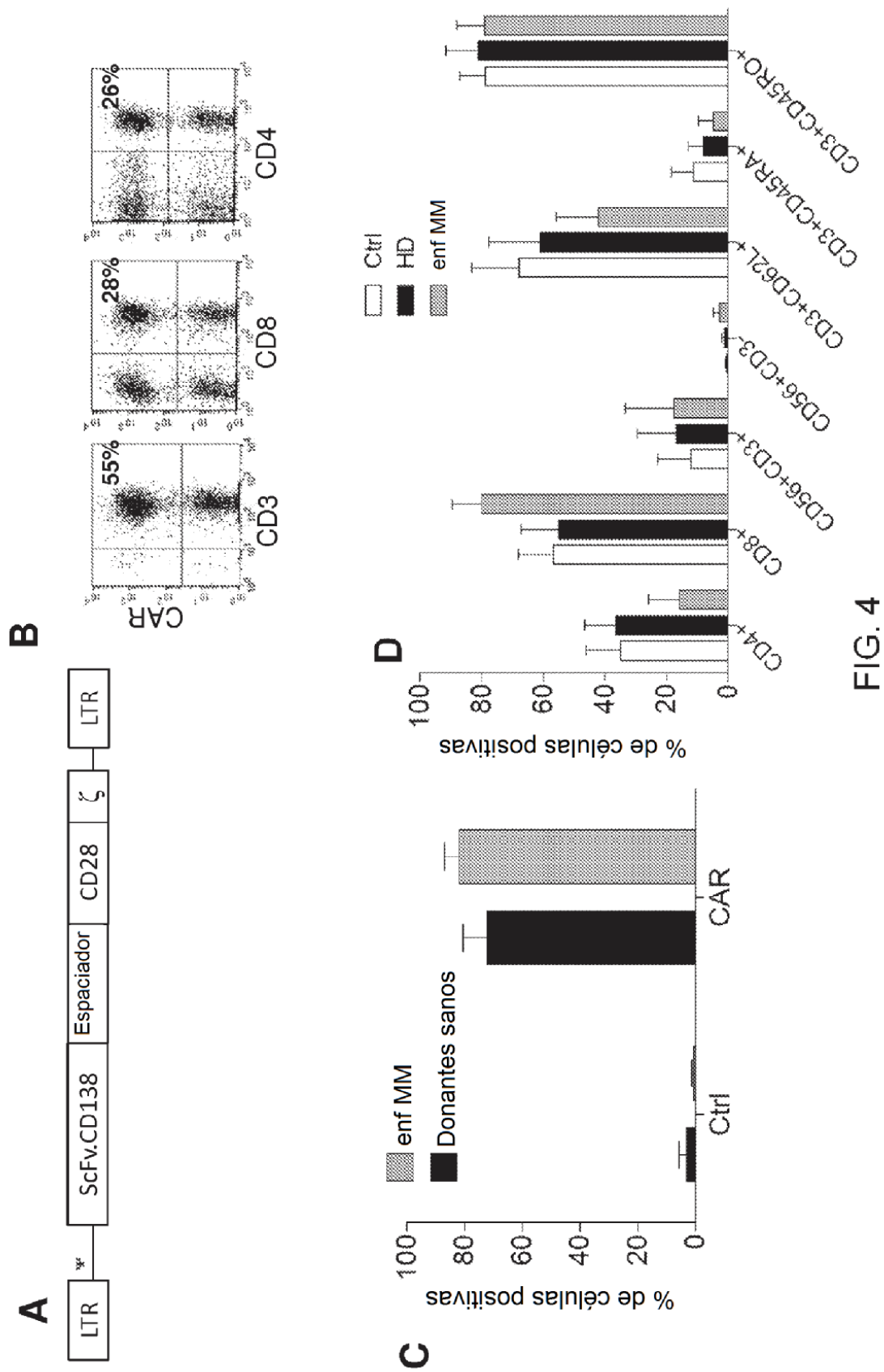


FIG. 3b





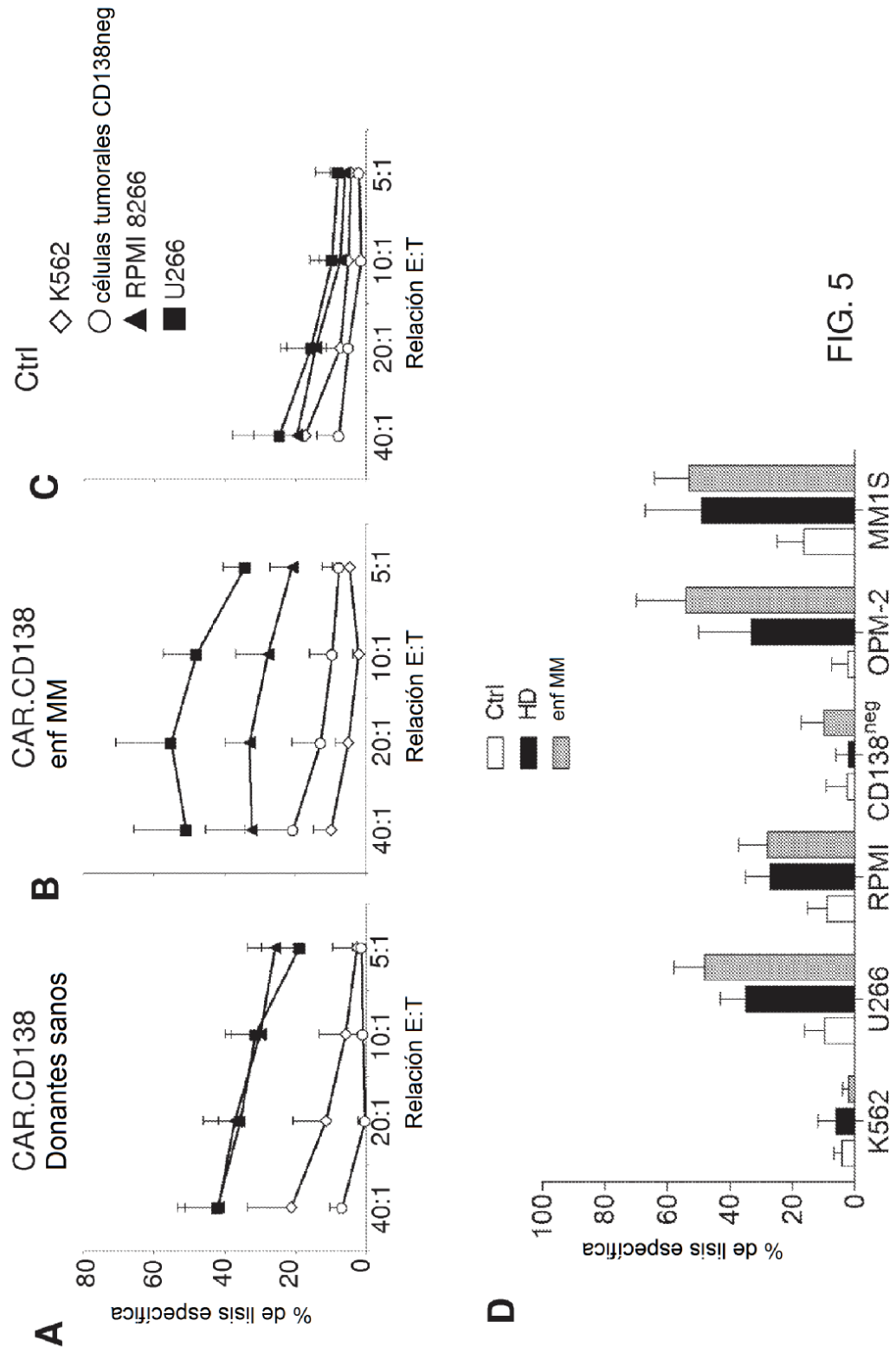


FIG. 5

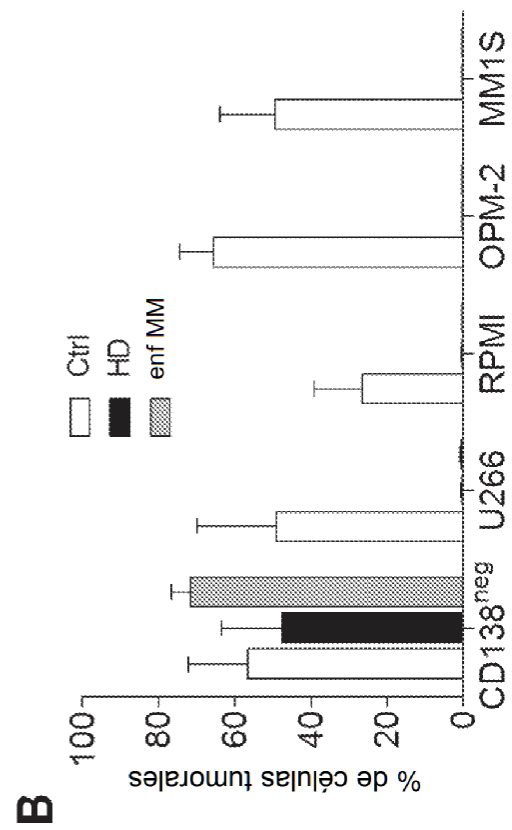
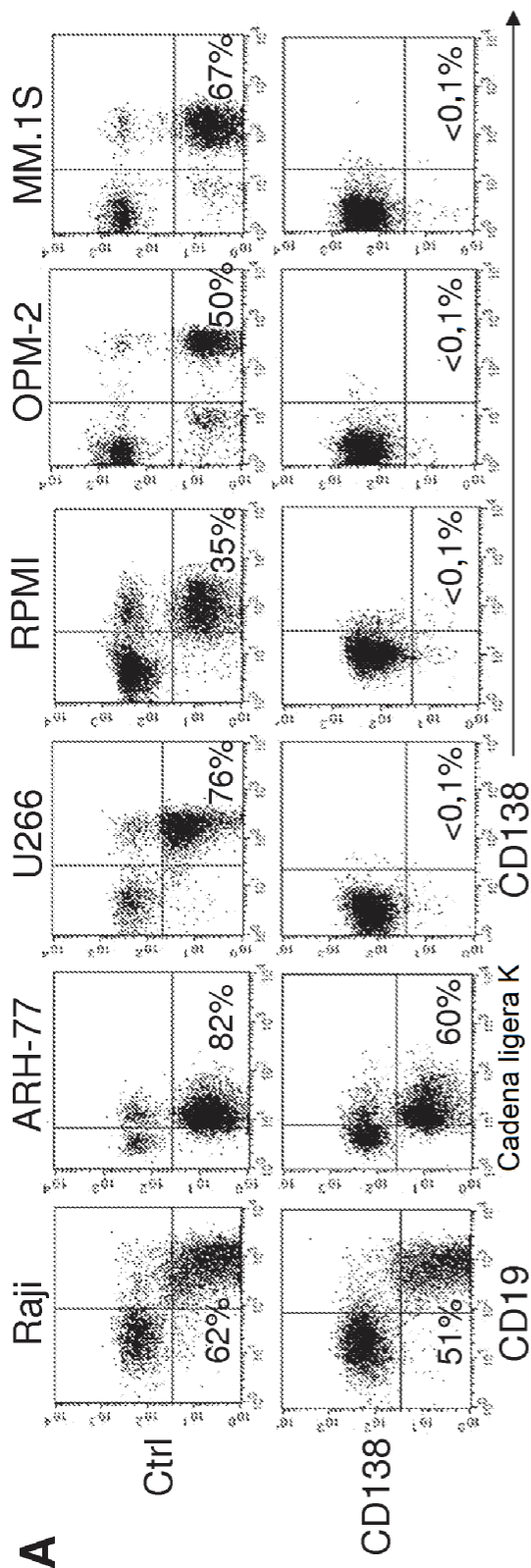


FIG. 6

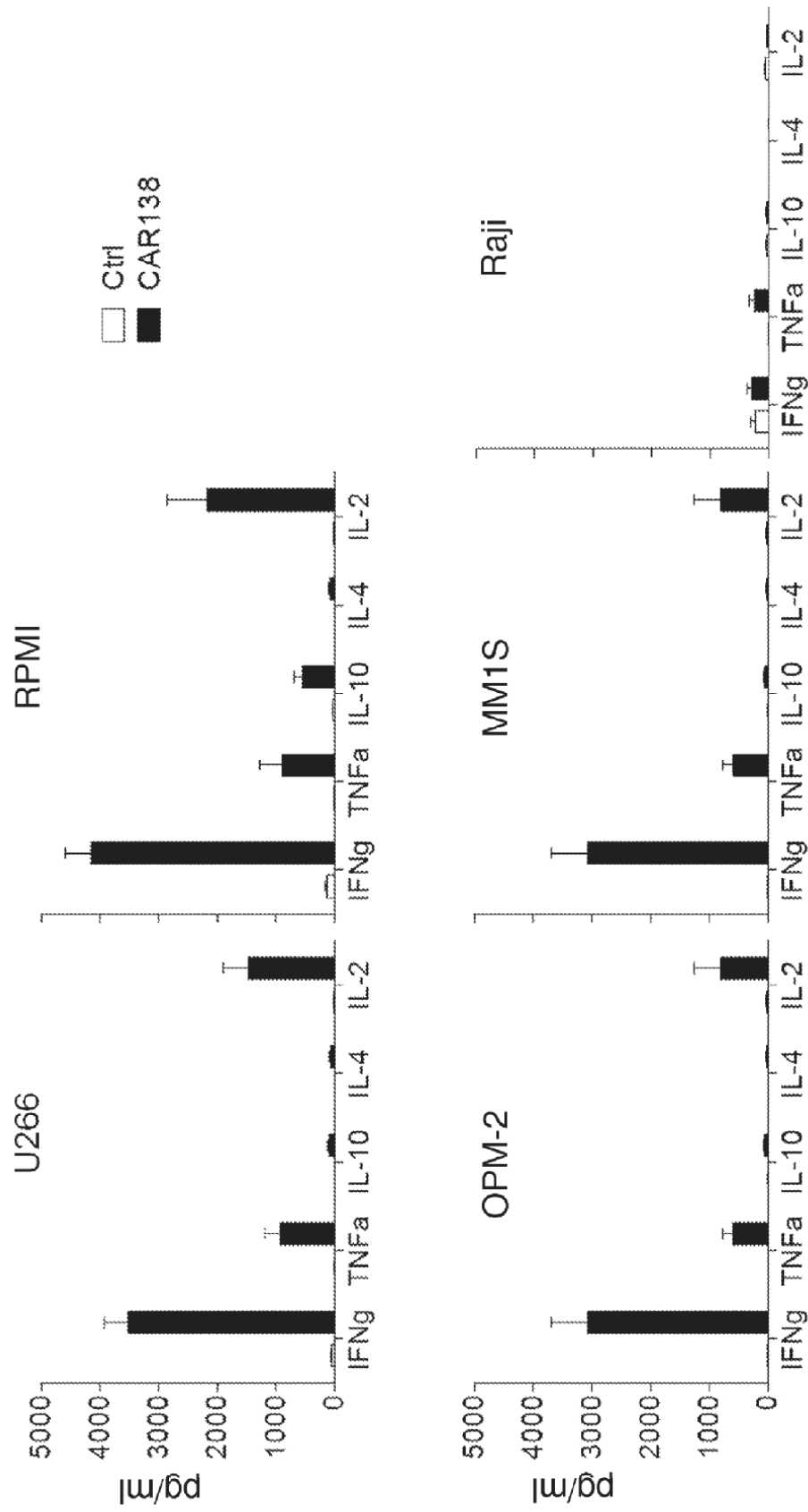
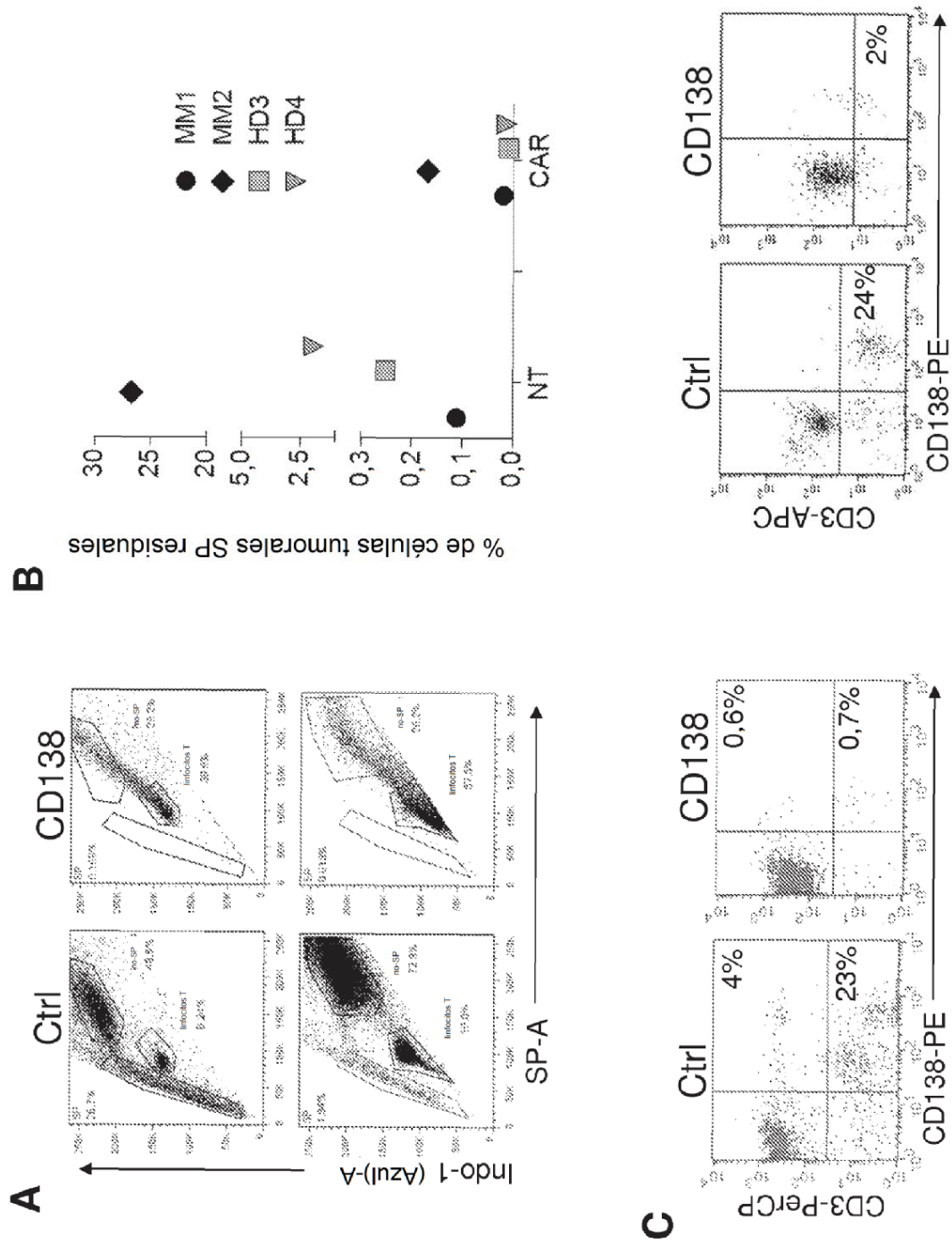
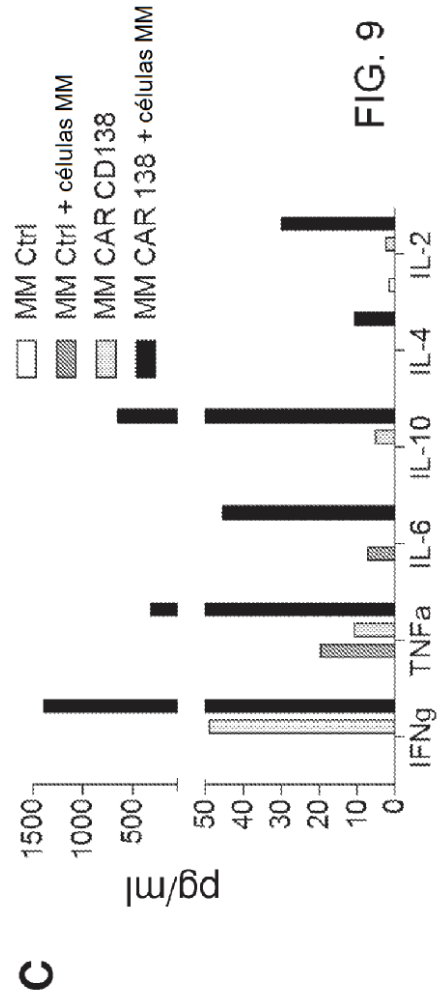
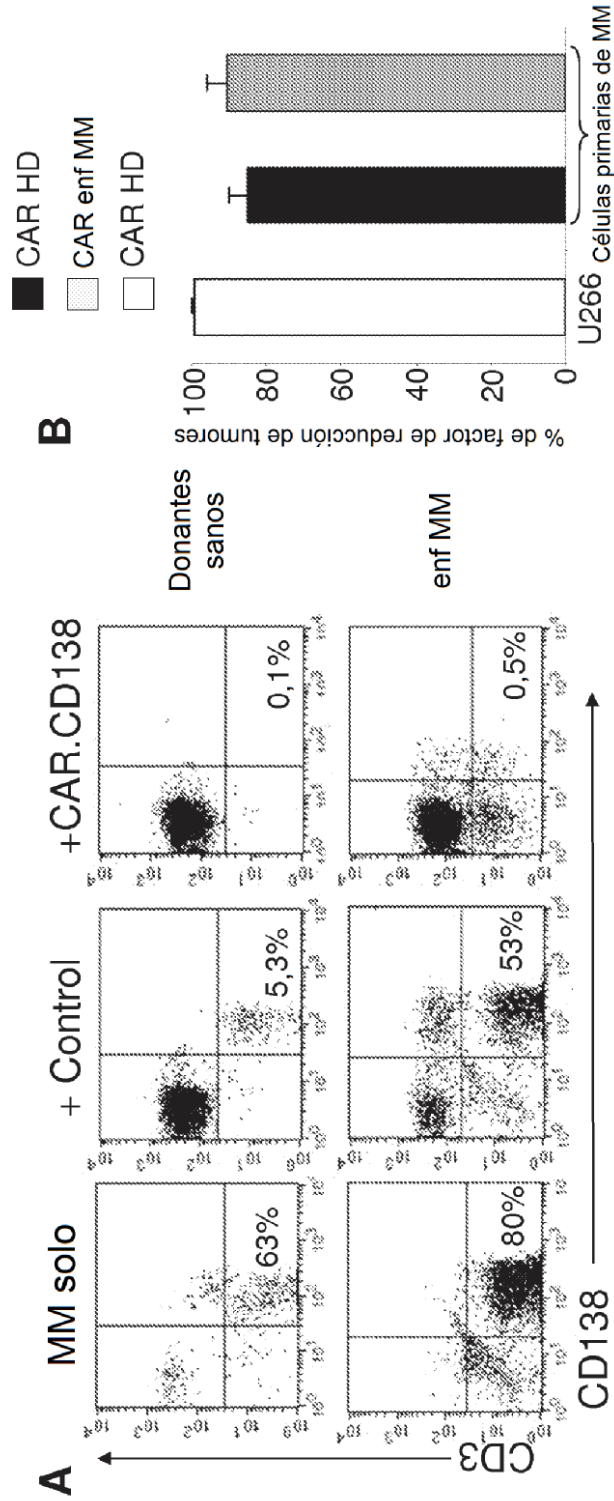


FIG. 7





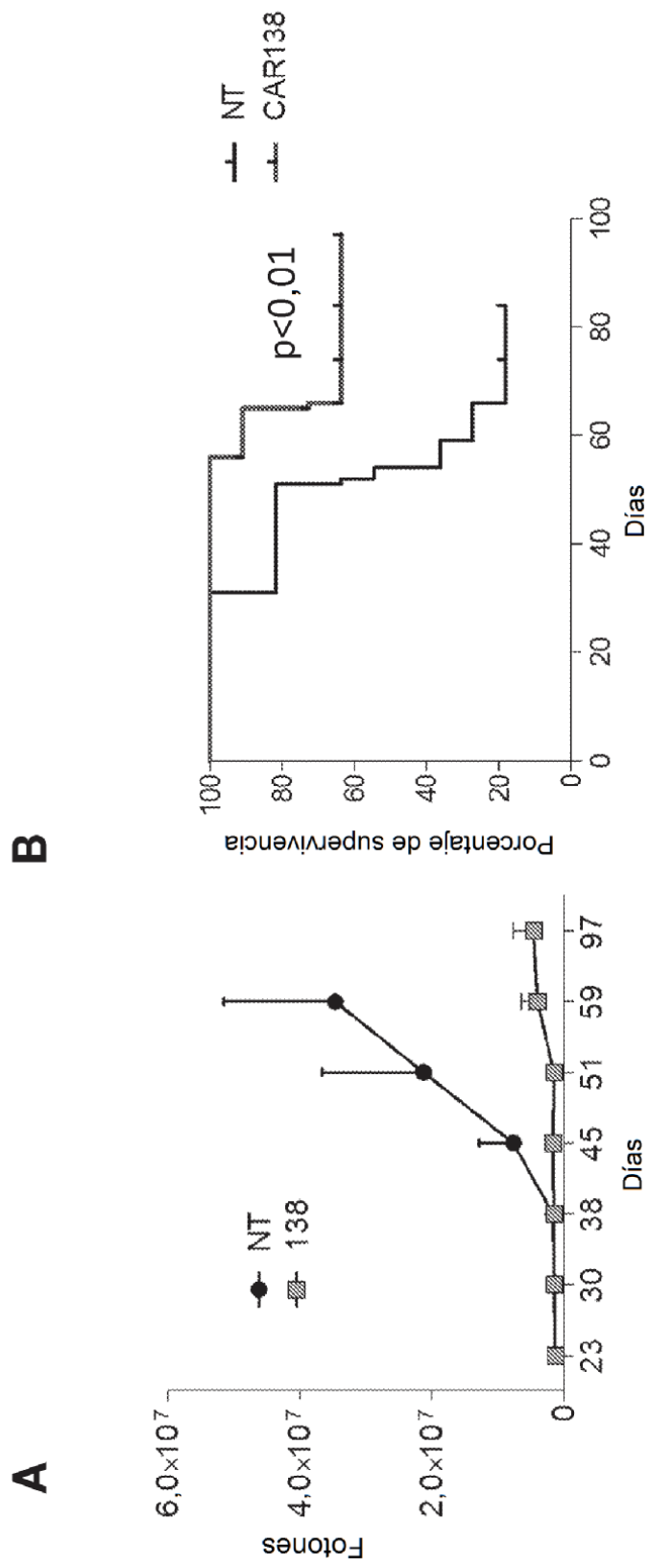


FIG. 10

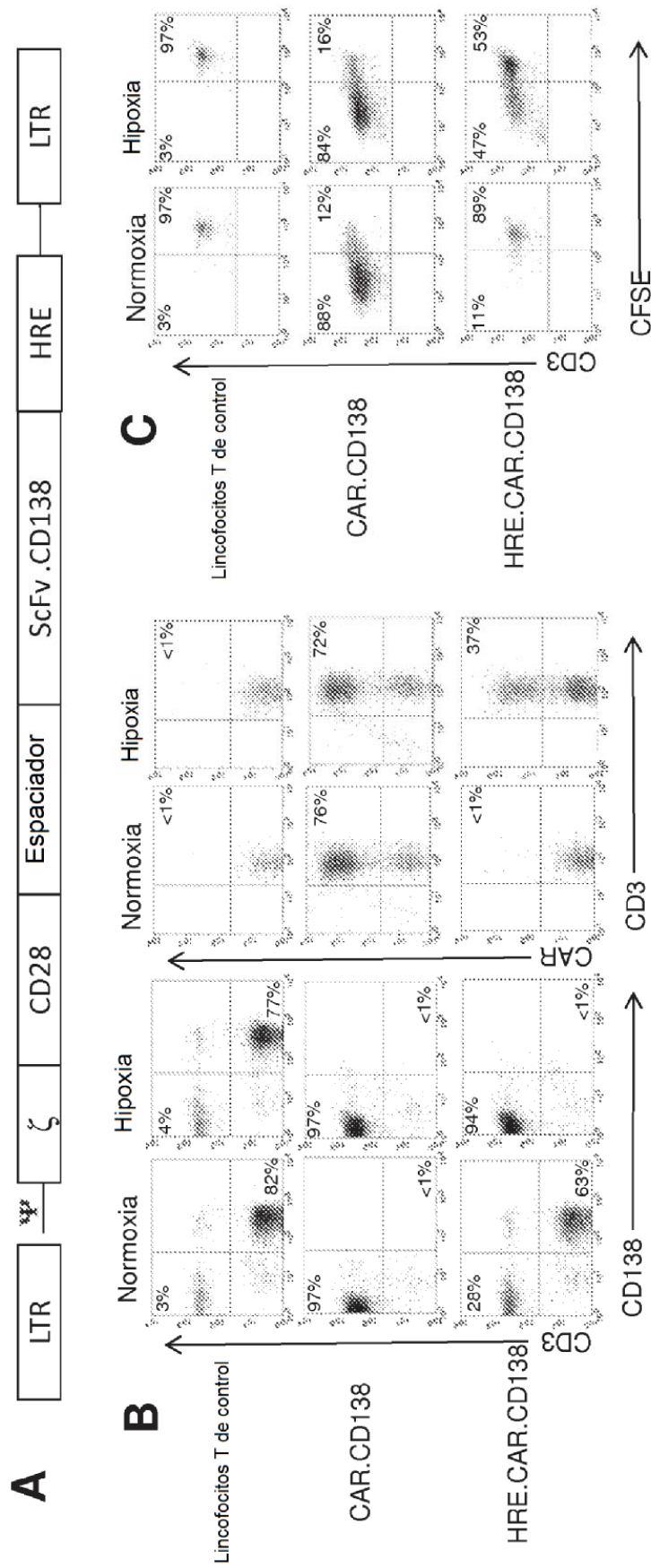


FIG. 11