

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 948**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 16/28</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/14</b>	(2015.01)
<b>C07K 16/46</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/17</b>	(2015.01)
<b>A61N 5/10</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/395</b>	(2006.01)
<b>A61K 45/06</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/30</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/40</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2014 PCT/US2014/020919**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014 WO14138306**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2014 E 14714473 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018 EP 2964675**

54 Título: **Células de acoplamiento para inmunoterapia**

30 Prioridad:

**05.03.2013 US 201361772803 P**  
**09.03.2013 US 201361775524 P**  
**16.01.2014 US 201461928383 P**  
**19.02.2014 US 201461941729 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.09.2018**

73 Titular/es:

**BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE (50.0%)**  
**One Baylor Plaza**  
**Houston, TX 77030, US y**  
**CELGENE CORPORATION (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GOTTSCHALK, STEPHEN, M. G.;**  
**SONG, XIAO-TONG;**  
**IWAHORI, KOTA;**  
**VELASQUEZ, MIREYA, PAULINA y**  
**ABBOTT, STERWART**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 681 948 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

Células de acoplamiento para inmunoterapia

5 **Campo técnico**

Los campos de la invención incluyen al menos inmunología, biología celular, biología molecular y medicina, incluyendo oncología.

10 **Antecedentes**

La inmunoterapia con linfocitos T específicos de antígeno ha demostrado ser prometedora en el tratamiento de tumores sólidos y neoplasias sanguíneas en modelos preclínicos así como en estudios clínicos de Fase I/II. Los linfocitos T modificados genéticamente con receptores de antígenos quiméricos (CAR, del inglés *chimeric antigen receptors*) o receptores de linfocitos T (TCR, del inglés *T-cell receptors*) modificados genéticamente permiten la rápida generación de linfocitos T específicos de antígeno. Sin embargo, ni los linfocitos T que expresan CAR ni los que expresan TCR redirigen el vasto reservorio de células inmunológicas residentes a tumores que limitan los efectos antitumorales.

Para solucionar esta limitación, en el presente documento se describe una nueva estrategia para generar células inmunológicas no solo específicas para células tumorales sino también para permitirles redireccionar células inmunológicas residentes hacia sitios del tumor. El objeto de estudio de la presente divulgación tiene aplicaciones no solo para el campo de la inmunoterapia del cáncer, sino para cualquier otra enfermedad en la que el sistema inmunológico se manipula con fines terapéuticos.

El documento WO 2009/091826 desvela composiciones y métodos relacionados con un polipéptido quimérico de receptor de linfocitos T específico de CD19 que comprende un dominio de señalización intracelular, un dominio transmembrana y un dominio extracelular, comprendiendo el dominio extracelular una región de unión a CD19.

30 **Sumario**

En un primer aspecto, en el presente documento se proporciona una composición que comprende o que consiste esencialmente en, o que consiste en, un acoplador, en donde dicho acoplador es una molécula que comprende un dominio de activación que se une a una molécula de activación sobre una superficie de célula inmunológica o una superficie de célula inmunológica modificada genéticamente, y un dominio de reconocimiento de antígeno que se une a un antígeno de célula diana, por ejemplo, un antígeno expresado sobre la superficie de una célula tumoral o de una célula cancerosa. La célula cancerosa puede ser de un tumor sólido o de una neoplasia sanguínea.

Las células de acoplamiento son células que tienen la capacidad de secretar moléculas acopladoras (FIG. 1) y en determinados aspectos de la invención, al individuo se le proporcionan células que proporcionan terapia al individuo. Las células (incluyendo linfocitos T y células NK) secretan acopladores que activan las células inmunológicas.

En determinados aspectos descritos en el presente documento, cuando el dominio de activación se une a la molécula de activación sobre la célula inmunológica, y el dominio de reconocimiento de antígeno se une al antígeno de la célula diana, la célula inmunológica elimina a la célula diana. El acoplador puede ser bipartito (por ejemplo, comprendiendo un dominio de activación y un dominio de reconocimiento de antígeno que opcionalmente se puede unir mediante un enlazador), o puede ser tripartito o multipartito (por ejemplo, que comprende uno o más dominios de activación y/o dominios de reconocimiento de antígeno, u otros dominios).

En determinadas realizaciones, el acoplador es una proteína, por ejemplo, una proteína diseñada genéticamente. En aspectos específicos descritos en el presente documento, el dominio de activación del acoplador es o comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno o una parte del mismo, por ejemplo, un fragmento variable de cadena única (scFv). En otros aspectos específicos descritos en el presente documento, el dominio de reconocimiento de antígeno es o comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno o una parte del mismo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o un scFv o puede comprender ligandos, péptidos, receptores solubles de linfocitos T o combinaciones de los mismos (FIG. 2). En determinadas realizaciones, el dominio de activación y el dominio de reconocimiento de antígeno se unen mediante un enlazador, por ejemplo, un enlazador peptídico.

El dominio de activación de una molécula acopladora puede proporcionar la activación a las células inmunológicas. El experto en la materia reconoce que las células inmunológicas tienen diferentes receptores de activación. Por ejemplo, CD3 es un receptor de activación sobre linfocitos T, mientras que CD16, NKG2D o Nkp30 son receptores de activación en células NK, y CD3 o un TCR invariante son los receptores de activación sobre células NKT. Las moléculas acopladoras que activan los linfocitos T pueden, por lo tanto, tener un dominio de activación diferente al de las moléculas acopladoras que activan las células NK (FIG. 2). En aspectos específicos descritos en el presente documento, por ejemplo, en donde la célula inmunológica es un linfocito T, la molécula de activación es una o más de CD3, por ejemplo, CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  o CD3 $\epsilon$ ; o CD27, CD28, CD40, CD134, CD137 y CD278. En otros aspectos

específicos descritos en el presente documento, por ejemplo, en donde la célula inmunológica es una célula NK, la molécula de activación es CD16, NKG2D o NKp30, o en donde la célula inmunológica es una célula NK, la molécula de activación es CD3 o un TCR invariante, o en donde la célula inmunológica es una célula NKT, la molécula de activación en un TCR invariante es CD1d.

5 La activación pueden dar como resultado bien una señal positiva o bien negativa. Los ejemplos para los dominios de activación de 'señal positiva' incluyen 1) scFvs que son específicas para (y activan) CD3 y ligandos o receptores de moléculas coestimuladoras, tales como CD28, CD134 y CD137; 2) dominios derivados de moléculas coestimuladoras, tales como CD80, CD70, CD134L (OX40L) y CD137L (41BBL); 3) citocinas, tales como IL-2, IL-7 y IL-15; y 4) quimiocinas tales como CCL1, CCL2, CCL 16, CCL 17, CCL 22, CXCL8 o RANTES. Los ejemplos para dominios de activación de 'señal negativa' incluyen 1) dominios derivados de moléculas inhibitoras, tales como PD-L1; 2) scFv específicos para moléculas inhibitoras tales como CTLA4 y PD-1, y 2) citocinas inhibitoras, tales como TGFβ y IL-10. En una realización específica, el dominio de activación es un scFv.

15 En otras determinadas realizaciones, el acoplador adicionalmente comprende uno o más dominios accesorios, por ejemplo, uno o más de una citocina, un dominio coestimulador, un dominio que inhibe las moléculas reguladoras negativas de la 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 coestimulador es CD27, CD80, CD86, CD134 o CD137. En otras realizaciones específicas, el dominio que inhibe las moléculas reguladoras negativas de la activación de linfocitos T es PD-1, PD-L1, CTLA4 o B7-H4.

25 Para cualquiera de los acopladores descritos en el presente documento, los respectivos dominios pueden estar en cualquier orden del extremo N-terminal al extremo C-terminal, incluyendo, por ejemplo, tener el dominio de activación en N-terminal hacia el dominio de reconocimiento de antígeno, tener el dominio de activación en C-terminal hacia el dominio de reconocimiento de antígeno, etcétera. En determinadas realizaciones, los linfocitos T se modifican para secretar moléculas acopladoras que tienen el dominio de reconocimiento de antígeno en N-terminal hacia el dominio de activación. En realizaciones particulares, dos o más de los dominios de una molécula de acoplador se separan mediante un enlazador. El enlazador puede ser de cualquier longitud adecuada, y tal parámetro se optimiza de manera habitual en la técnica. Por ejemplo, los enlazadores pueden ser de una longitud y una secuencia suficiente como para asegurar que cada primer y segundo dominios puedan, de manera independiente entre ellos, conservar sus diferentes especificidades de unión.

35 En determinadas realizaciones, el antígeno unido mediante el dominio de reconocimiento de antígeno es un antígeno asociado al tumor (AAT) o un antígeno específico del tumor (AET). En determinadas realizaciones, el dominio de reconocimiento del antígeno del acoplador es un scFv que es específico para un AAT o un AET. En una realización específica, el AAT o el AET se expresa sobre una célula cancerosa. En una realización, el AAT o el AET se expresa sobre una célula cancerosa de la sangre. En otra realización, el AAT o el AET se expresa sobre una célula de un tumor sólido. En realizaciones más específicas, el tumor sólido es un glioblastoma, un cáncer de pulmón no microcítico, un cáncer de pulmón que no sea cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de estómago, un cáncer del bazo, cáncer de piel, un cáncer cerebral que no sea un glioblastoma, un cáncer de riñón, un cáncer de tiroides o similares. En realizaciones más específicas, el AAT o el AET se expresa por una célula tumoral en un individuo. En aspectos específicos descritos en el presente documento, el AAT o el AET es uno o más de, por ejemplo, un scFv sobre el acoplador es específico para uno o más de 5T4, 8H9, integrina α<sub>v</sub>β<sub>6</sub>, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CA9, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR que incluye ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, ERBB3, ERBB4, ErbB3/4, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, FBP, AchR fetal, FRα, GD2, GD3, Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, IL-11Rα, IL-13Rα2, Lambda, Lewis-Y, Kappa, KDR, MCSP, Mesotelina, Muc1, Muc16, NCAM, ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSC1, PSCA, PSMA, ROR1, SP17, Survivina, TAG72, TEMs, antígeno carcinoembrionario, HMW-MAA y VEGFR2.

55 El dominio particular de reconocimiento celular de la molécula de acoplador se puede adaptar para que reconozca un correspondiente tumor que expresa un antígeno particular. Los antígenos se puede producir bien por una célula cancerosa o bien por el llamado estroma tumoral, que ayuda al crecimiento tumoral. En algunos casos, el scFv es específico para EphA2, CD19, CD123, LeY, B7H3, HER2 o EGFR (incluyendo EGFRvIII). Los antígenos ejemplares se enumeran en la **Tabla 1**.

**Tabla 1: Ejemplos de antígenos direccionables**

Antígeno
5T4
integrina α <sub>v</sub> β <sub>6</sub>
B7-H3

## ES 2 681 948 T3

Antígeno
B7-H6
CD19
CD20
CD22
CD30
CD33
CD44, CD44v6, CD44v7/8
CD70
CD123
CEA
CSPG4
EGFR, familia de EGFR que incluye ErbB2 (HER2)
EGFRvIII
EGP2
EGP40
EpCAM
EphA2
FAP
AchR fetal
FR $\alpha$
GD2
GD3
Glypican-3 (GPC3)
HLA-A1:MAGE1
HLA-A2:MAGE1
HLA-A3:MAGE1
HLA-A1:NY-ESO-1
HLA-A2:NY-ESO-1
HLA-A3:NY-ESO-1
IL-11R $\alpha$
IL-13R $\alpha$ 2
Lambda
Lewis Y
Kappa
Mesotelina
Muc1
Muc1 6
NCAM

Antígeno
ligandos de NKG2D
NY-ESO-1
PRAME
PSCA
PSMA
ROR1
TAG72
TEMs
VEGFR2

- Además de los ejemplos de antígenos enumerados en la **Tabla 1**, el dominio de reconocimiento de antígeno también se puede dirigir a otros antígenos; por ejemplo, las moléculas inhibitoras expresadas sobre células cancerosas o células en el microambiente tumoral, tales como PD-L1 y CTLA4. Una molécula de acoplador que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno específico de PD-L1 y un dominio de activación de linfocitos T específico de CD3 superaría la inmunosupresión mediada por el tumor convirtiendo una señal inhibitora en una señal positiva (de activación de CD3). Otros ejemplos son antígenos que están presentes en la matriz extracelular de tumores tales como variantes oncofetales de fibronectina, tenascina o regiones necróticas de tumores.
- 10 En otro aspecto, en el presente documento se proporciona un polinucleótido que codifica una molécula de acoplador, por ejemplo, cualquiera de las moléculas de acoplador descritas en el presente documento. El polinucleótido puede estar comprendido en, o comprender, un vector. Se puede emplear cualquier tipo de vector adecuado, pero en realizaciones específicas, el vector es un vector no vírico (por ejemplo, un plásmido, un vector de minicírculos de ADN, un plásmido bella durmiente (*sleeping beauty*), un plásmido piggybac, etcétera) o un vector vírico (por ejemplo, un vector de lentivirus, un vector de adenovirus, un vector de retrovirus, un vector de virus adenoasociado, un vector oncolítico, etcétera). En una realización específica, el polinucleótido expresa de manera estable la molécula de acoplador en una célula que contiene el polinucleótido. En otra realización específica, el polinucleótido expresa de manera transitoria la molécula de acoplador en una célula que contiene el polinucleótido. En otra realización específica, el polinucleótido permite la expresión inducible de la molécula de acoplador en una célula que contiene el polinucleótido. En otra realización específica, el polinucleótido permite la represión inducible de la expresión de la molécula de acoplador en una célula que contiene el polinucleótido. En cualquiera de las realizaciones proporcionadas en el presente documento, el polinucleótido preferentemente codifica el acoplador en una forma que sea secretable por la célula. El polinucleótido codifica una molécula de fusión que comprende un dominio de activación y un dominio de reconocimiento de antígeno, y en realizaciones específicas, cada dominio es un scFv. El dominio de activación se puede colocar hacia el extremo N-terminal del polipéptido en relación con el dominio de reconocimiento de antígeno, o el dominio de activación se puede colocar hacia el extremo C-terminal del polipéptido en relación con el dominio de reconocimiento del antígeno.
- 30 En otro aspecto, en el presente documento se proporciona una célula que se ha diseñado genéticamente para expresar uno o más acopladores, por ejemplo, cualquiera de las moléculas de acoplador descritas en el presente documento (por ejemplo, citada como una "célula de acoplamiento"). En determinados aspectos descritos en el presente documento, la célula diseñada genéticamente es, por ejemplo, un linfocito T (célula T), un linfocito T CAR, un linfocito T citolítico natural (NK) o una célula NK. En otros determinados aspectos descritos en el presente documento, la célula diseñada genéticamente es una célula no inmunológica, por ejemplo, una célula madre mesenquimal (MSC), una célula madre neuronal, una célula madre hematopoyética, una células madre pluripotente inducida (célula iPS), una célula madre embrionaria. En determinadas realizaciones, la célula de acoplamiento secreta el acoplador en el ambiente que rodea a la célula de acoplamiento, por ejemplo, el medio de cultivo (cuando la célula de acoplamiento se cultiva *in vitro*) o en un individuo al que se le ha administrado la célula de acoplamiento). Aunque en determinadas realizaciones se puede emplear un vector de lentivirus, en algunos casos se puede emplear un vector de retrovirus que tiene una mayor eficacia en la transducción. Un vector de retrovirus ejemplar comprende en una dirección de 5' a 3' CD19scFv-CD3scFv. Otro vector de retrovirus ejemplar comprende en una dirección de 5' a 3' EphA2(4H5)-CD3scFv, seguido opcionalmente por un IRES seguido por una secuencia de nucleótidos que codifica un marcador fluorescente o seleccionable, por ejemplo, mOrange.
- 45 En determinadas realizaciones, una célula secreta más de un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) tipo de molécula de acoplador. Se puede modificar la célula para que lleve polinucleótidos no idénticos que expresan moléculas de acoplador no idénticas. Por ejemplo, una célula puede comprender un polinucleótido que codifica una molécula de acoplador y también comprender uno u otros polinucleótidos más que codifican otras moléculas de acopladores. En realizaciones específicas, la célula lleva un primer nucleótido que codifica una molécula de

acoplador que se dirige a uno de los antígenos enumerados en la **Tabla 1** y un segundo polinucleótido que codifica una molécula de acoplador que se dirige a otro antígeno enumerado en la **Tabla 1**. Además de los diferentes dominios de reconocimiento de antígeno, los acopladores descritos en el presente documento también pueden contener diferentes dominios de activación, de manera que las células inmunológicas puedan activar linfocitos T, células NK o ambos. Por lo tanto, los aspectos de la divulgación proporcionan linfocitos T que por ejemplo secretan moléculas de acoplador que pueden activar células NK y/o linfocitos T y células NK que activan células NK y/o linfocitos T.

Aunque en realizaciones específicas las moléculas de acoplamiento de la presente invención tampoco comprenden un CAR, un TCR diseñado genéticamente o cualquier otra modificación genética, en determinadas realizaciones, los linfocitos T de acoplamiento también comprenden un CAR, incluyendo uno que se dirige a antígenos enumerados en la **Tabla 1**, un TCR diseñado genéticamente o cualquier otra modificación genética que pueda mejorar su función. En una realización, un CAR o un TCR diseñado genéticamente que expresa linfocitos T comprende una o más moléculas de acoplador. En una realización particular, un dominio de unión a antígeno de un CAR o TCR y un dominio de reconocimiento de antígeno de una molécula de acoplador reconoce o se une al mismo antígeno diana. En una determinada realización, un dominio de unión a antígeno de un CAR y un dominio de reconocimiento de antígeno de una molécula de acoplador reconocen o se unen a diferentes antígenos diana expresados sobre la misma célula diana. En una realización específica, una célula comprende un polinucleótido que expresa una molécula de acoplador y también comprende uno o más polinucleótidos que expresan moléculas coestimuladoras, incluyendo CD80, CD70, CD134L (OX40L) y CD137L (41BBL). En realizaciones específicas, la célula lleva un primer polinucleótido que codifica una molécula de acoplador que se dirige a CD19 y un segundo polinucleótido que codifica CD80 y 41BBL (**FIG. 22**).

En aspectos particulares descritos en el presente documento, hay composiciones farmacéuticas que incluyen una molécula de acoplador y/o una o más células que secretan una molécula de acoplador, incluyendo una que tiene un dominio de activación que se une a una diana sobre una superficie de célula inmunológica o a una superficie de célula inmunológica diseñada genéticamente y también un dominio de reconocimiento que se une a una o más moléculas producidas por una célula diana. Una cantidad eficaz de moléculas de acoplador o células que las secretan se dan a un individuo que lo necesite.

En otro aspecto, en el presente documento se proporciona un método de tratamiento para un individuo que tiene una célula tumoral, que comprende la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de acoplador, en donde la molécula de acoplador comprende un dominio de reconocimiento de antígeno que se une a un antígeno en la célula tumoral. En un aspecto relacionado, en el presente documento se proporciona un método de tratamiento para un individuo que tiene una célula tumoral, que comprende la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de células de acoplamiento que secretan una o más moléculas de acoplador, en donde las moléculas de acoplador comprenden un dominio de reconocimiento de antígeno que se une a un antígeno en la célula tumoral. En aspectos específicos descritos en el presente documento, dicha administración da como resultado una disminución medible en el crecimiento del tumor en el individuo. En otros aspectos específicos descritos en el presente documento, dicha administración da como resultado una disminución medible en el tamaño del tumor en el individuo. En diversos aspectos descritos en el presente documento, el tamaño o la tasa de crecimiento de un tumor se puede determinar mediante, por ejemplo, obtención de imágenes directas (por ejemplo, escaneo de TC, IRM, escaneo de PET o similares), obtención de imágenes por fluorescencia, biopsia de tejidos y/o evaluación de marcadores fisiológicos relevantes (por ejemplo, niveles de APE para el cáncer de próstata; niveles de GCH para coriocarcinoma y similares). En aspectos específicos descritos en el presente documento, el individuo tiene un alto nivel de un antígeno, por ejemplo, EphA2, que se correlaciona con un mal pronóstico. En algunos aspectos descritos en el presente documento, al individuo se le proporciona una terapia de cáncer adicional, tal como cirugía, radiación, quimioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia o una combinación de las mismas.

En aspectos particulares descritos en el presente documento, hay una célula que secreta una composición, comprendiendo dicha composición: un dominio de activación que se une a una diana sobre una superficie de célula inmunológica natural o una superficie de célula inmunológica diseñada genéticamente; y un dominio de reconocimiento de antígeno que se une a una o más moléculas producidas por una célula diana. El dominio de activación y el dominio de reconocimiento de antígeno se unen mediante un enlazador, en al menos algunos casos. El dominio de activación puede comprender un anticuerpo o un ligando. En aspectos específicos descritos en el presente documento, la célula inmunológica es un linfocito T y el anticuerpo reconoce CD3, aunque la célula inmunológica puede ser una célula NK y el anticuerpo reconoce CD16, NKG2D o NKp30. En aspectos particulares descritos en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo de fragmento variable de cadena única (scFv). En aspectos específicos descritos en el presente documento, el dominio de reconocimiento de antígeno es un anticuerpo que reconoce un antígeno producido por células diana, y en algunos casos, el anticuerpo es un fragmento scFv.

En aspectos particulares descritos en el presente documento, el dominio de reconocimiento de antígeno es un ligando, un péptido, un TCR soluble, o reconoce un antígeno de la **Tabla 1**.

Las composiciones particularmente ejemplares de la divulgación comprenden la secuencia de la SEQ ID NO:1, la SEQ ID NO:2, la SEQ ID NO:3, la SEQ ID NO:4, la SEQ ID NO:5, la SEQ ID NO:6, la SEQ ID NO:7, la SEQ ID NO:8 o la SEQ ID NO:9, por ejemplo.

- 5 Algunas composiciones de la divulgación comprenden adicionalmente uno o más de lo siguiente: una citocina; un dominio coestimulador; o un dominio para la inhibición de moléculas reguladoras negativas de la activación de linfocitos T. En aspectos específicos descritos en el presente documento, la citocina es IL-15. En determinados aspectos, el dominio coestimulador es CD80, CD137 o ambos. En aspectos particulares, el dominio para la inhibición de las moléculas reguladoras negativas de la activación de linfocitos T comprende PD-1, PD-L1, CTLA4 o B7-H4.
- 10 Algunas composiciones de la divulgación comprenden un marcador detectable.

En un aspecto descrito en el presente documento, hay un método de tratamiento de un individuo con cáncer, que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más células de la divulgación al individuo. En aspectos específicos descritos en el presente documento, la composición se secreta por las células y la composición se une a y activa las células. En determinados aspectos, la composición se secreta por las células y la composición se une a y activa las células inmunológicas naturales en el individuo. En aspectos particulares descritos en el presente documento, las células que son capaces de expresar la composición son linfocitos T y el dominio de activación comprende un anticuerpo que reconoce CD3. En otros aspectos, las células que son capaces de expresar la composición son células NK y el dominio de activación comprende un anticuerpo que reconoce CD16, NKG2D o NKp30. En un aspecto, el cáncer es positivo para EphA2, positivo para CD19, positivo para CD123, positivo para LeY, positivo para B7H3, positivo para HER2 o positivo para EGFR (incluyendo EGFRvIII).

15

20

En aspectos descritos en el presente documento, hay una composición que comprende una célula que secreta un polipéptido, comprendiendo dicho polipéptido: un dominio de activación que se une a una diana sobre una superficie de célula inmunológica diseñada genéticamente; y un dominio de reconocimiento de antígeno que se une a una o más moléculas producidas por o presentes en una célula diana. En aspectos específicos descritos en el presente documento, el dominio de activación y el dominio de reconocimiento de antígeno se unen mediante un enlazador. En realizaciones específicas, la célula inmunológica es una célula inmunológica natural. En determinados aspectos descritos en el presente documento, la célula inmunológica es una célula inmunológica diseñada genéticamente. En realizaciones particulares, el dominio de activación comprende un anticuerpo, ligando, receptor o péptido. En aspectos particulares descritos en el presente documento, la célula inmunológica es un linfocito T y el anticuerpo reconoce CD3. En algunos aspectos descritos en el presente documento, la célula inmunológica es una célula NK y el anticuerpo reconoce CD16, NKG2D o NKp30. En determinados aspectos descritos en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo de fragmento variable de cadena única (scFv). En aspectos particulares descritos en el presente documento, el dominio de reconocimiento de antígeno es un anticuerpo que reconoce un antígeno producido por células diana. En algunos aspectos descritos en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo scFv. En aspectos particulares descritos en el presente documento, el dominio de reconocimiento de antígeno es un ligando, un péptido o un TCR soluble. En aspectos específicos descritos en el presente documento, el dominio de reconocimiento de antígeno reconoce un antígeno de la Tabla 1. En aspectos particulares descritos en el presente documento, el polipéptido comprende la secuencia de la SEQ ID NO:1, la SEQ ID NO:2, la SEQ ID NO:3, la SEQ ID NO:4, la SEQ ID NO:5, la SEQ ID NO:6, la SEQ ID NO:7, la SEQ ID NO:8 o la SEQ ID NO:9. En determinados aspectos descritos en el presente documento, el polipéptido comprende adicionalmente uno o más de lo siguiente: una citocina; un dominio coestimulador; o un dominio para la inhibición de moléculas reguladoras negativas de la activación de linfocitos T. En aspectos específicos descritos en el presente documento, la citocina es IL-15, IL-12, IL-2 o IL-7. En aspectos específicos descritos en el presente documento, el dominio coestimulador es CD80, CD134, CD137 o una combinación de los mismos. En determinados aspectos descritos en el presente documento, el dominio para la inhibición de las moléculas reguladoras negativas de la activación de linfocitos T comprende PD-1, PD-L1, CTLA4 o B7-H4. En algunos aspectos descritos en el presente documento, el polipéptido comprende adicionalmente un marcador detectable. En algunos aspectos descritos en el presente documento, la célula comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido. En determinados aspectos descritos en el presente documento, el polinucleótido se integra en el genoma de la célula. En aspectos particulares descritos en el presente documento, la expresión del polinucleótido que codifica el polipéptido está bajo el control de uno o más factores asociados al tumor. En algunos aspectos descritos en el presente documento, el uno o más factores asociados al tumor es una quimiocina o citocina. Las quimiocinas pueden ser de una familia seleccionada del grupo que consiste en las quimiocinas CC, CXC, C y CX3C, incluyendo CCL2, CCL3, CCL5, CCL16, CXCL8, CXCL10, XCL1, XCL2 o CX3CL1. Las citocinas se pueden seleccionar del grupo que consiste en IL2, IL4, IL5, IL7, IL10, IL12, IL15 y IL17. En aspectos específicos descritos en el presente documento, la expresión del polinucleótido que codifica el polipéptido está bajo el control de una secuencia reguladora específica del tejido. En algunos aspectos descritos en el presente documento, la secuencia reguladora específica del tejido es una secuencia reguladora específica de hipoxia. En determinados aspectos descritos en el presente documento, la secuencia reguladora específica de hipoxia es un elemento de respuesta a la hipoxia (ERH) o un dominio de degradación dependiente de oxígeno (DDDO). En algunos aspectos, el ERH comprende 5'-RCGTG-3' (SEQ ID NO:10).

25

30

35

40

45

50

55

60

En un aspecto descrito en el presente documento t, hay un método de tratamiento de un individuo con cáncer, que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación al individuo. En aspectos específicos descritos en el presente documento, el polipéptido se secreta por las células y la

65

composición se une a y activa las células, y en al menos algunos casos, el polipéptido se secreta por las células y el polipéptido se une a y activa las células inmunológicas naturales en el individuo. En algunos aspectos descritos en el presente documento, las células que son capaces de expresar el polipéptido son linfocitos T. En determinados aspectos descritos en el presente documento, el dominio de activación comprende un anticuerpo que reconoce CD3.

5 En algunos aspectos descritos en el presente documento, las células que son capaces de expresar el polipéptido son células NK. En aspectos específicos descritos en el presente documento, el dominio de activación comprende un anticuerpo que reconoce CD16, NKG2D o NKp30. En determinados aspectos descritos en el presente documento, el cáncer es positivo para EphA2, positivo para CD19, positivo para CD123, positivo para LeY, positivo para B7H3, positivo para HER2 o positivo para EGFR, y puede ser positivo para EGFRVIII.

10 La presente invención proporciona:

- Una célula que comprende un vector de polinucleótido que codifica una molécula bipartita que comprende un dominio de activación que se une a una o más moléculas de superficie celular y un dominio de reconocimiento de antígeno que se une a EphA2 y/o CD19, en donde el dominio de activación es un fragmento variable de cadena única (scFv) que reconoce CD3 y en donde la célula es un linfocito T o una célula NK;
- Una célula de la invención para su uso en un método de tratamiento de un individuo con cáncer, comprendiendo el método la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de las células al individuo; y
- Un vector de polinucleótido que codifica una molécula bipartita que comprende un dominio de activación que se une a una o más moléculas de superficie celular y un dominio de reconocimiento de antígeno que se une a EphA2 y CD19, en donde el dominio de activación es un fragmento variable de cadena única (scFv) que reconoce CD3.

#### 25 Breve descripción de los dibujos

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

30 La **FIG. 1** representa el concepto de aspectos de las células de acoplamiento.

La **FIG. 2** representa el concepto de aspectos de los linfocitos T y las células NK de acoplamiento.

La **FIG. 3** muestra un linfocito T de acoplamiento.

35 La **FIG. 4** muestra la generación de linfocitos T EphA2-ENG. **(A)** Esquema de vector de retrovirus (IRES: sitio interno de entrada al ribosoma; mO: mOrange). **(B)** Análisis de FACS para mOrange de linfocitos T transducidos y NT. **(C)** qRT-PCR para EphA2-acoplador de linfocitos T transducidos y NT.

40 La **FIG. 5** demuestra que las moléculas de acoplador específicas de EphA2 se unen a la superficie celular de linfocitos T y que se secretan por linfocitos T. **(A)** Esquema de vectores de retrovirus que codifican un EphA2-ENG y EphA2-ENG con un marcador 6xHis-Myc en C-terminal (EphA2-HM). Se generó EphA2-HM insertando un marcador 6xHisMyc antes del codón de parada. Los linfocitos T EphA2-ENG y EphA2-HM ENG se generaron mediante transducción de retrovirus y el 73 % de los linfocitos T de la posttransducción (EphA2-ENG) o el 57 % (EphA2-HM ENG) fueron positivos para mOrange mediante análisis FACS (datos no mostrados). **(B)** Ensayo de citotoxicidad usando linfocitos T NT, EphA2-ENG y EphA2-HM como efectores y células U373 positivas en EphA2 como células diana. No hubo diferencias significativas entre los linfocitos T EphA2-ENG y los EphA2-HM ENG, lo que indica que el marcador no interfiere con la función de la molécula de acoplador. **(C)** Análisis FACS de linfocitos T EphA2-ENG y EphA2-HM ENG seleccionados sobre células positivas a mOrange y negativas a mOrange (curva abierta: isotipo, Curva rellena: amyc-APC (Abcam, Cambridge, MA). Los linfocitos T EphA2-ENG no presentaron tinción en superficie celular. Los linfocitos T EphA2-ENG-HM se tiñeron con amyc-APC. Los linfocitos T transducidos (mOrange+) y no transducidos (mOrange-) fueron positivos, lo que indica que los linfocitos T transducidos secretan moléculas de acoplador que se unen a linfocitos T no transducidos. **(D)** El medio de los linfocitos T NT, EphA2-ENG o EphA2-HM ENG se incubaron con His Mag Sepharose excel (GE Healthcare). Las perlas se lavaron y la fracción unida se eluyó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fracción eluida se separó mediante SDS-PAGE y se transfirió con  $\alpha$ Myc (Abcam) seguido por un anticuerpo IgG de ratón en cabra conjugado con HRP (Santa Cruz Biotechnology); \*: banda inespecífica.

55 La **FIG. 6** demuestra que los linfocitos T EphA2-ENG secretan citocinas, proliferan y destruyen células diana de una forma específica de antígeno. **(A)** Los linfocitos T EphA2-ENG, CD19-ENG y NT se cocultivaron con células tumorales positivas en EphA2 (U373, A549, K562-EphA2) o negativas en EphA2 (K562) en una proporción de 10:1. Después de 24 horas, se determinó la producción de IFN $\gamma$  e IL2 mediante ELISA (n=4). **(B)** Los linfocitos T EphA2-ENG, CD19-ENG y NT se cocultivaron con células tumorales positivas en EphA2 (U373, A549) en una proporción de 10:1. Después de 7 días, se contó el número de linfocitos T viables mediante tinción con azul tripan (n=4). **(C)** Se realizaron ensayos de citotoxicidad usando linfocitos T EphA2-ENG, CD19-ENG y NT como efectores y células tumorales positivas en EphA2 (U373, A549, K562-EphA2) y negativas en EphA2 (K562) como dianas (media  $\pm$  DT; n=4).

La **FIG. 7** demuestra la generación de linfocitos T que secretan moléculas de acoplador específicas de CD19. **(A)** Esquema de vector de retrovirus. **(B)** Análisis de FACS para mOrange de linfocitos T transducidos y NT. **(C)** En ensayos de citotoxicidad, solo los linfocitos T CD19-ENG eliminaron las líneas celulares CD19+ (Daudi, Raji, BV173) al contrario de los linfocitos T no transducidos (NT) a una proporción E:D de 2,5:1 (n=4; p<0,05). **(D)** Solo los linfocitos T CD19-ENG secretaron niveles significativos de IFN- $\gamma$  en ensayos de cocultivo con dianas CD19+ (n=3; linfocitos T CD19-ENG frente a linfocitos T EphA2-ENG para BV173, Daudi, Raji: p<0,05). La producción consistente de IL-2 fue específica para dianas CD19 + y ws estuvo influenciado por la expresión de CD80 y CD86 en células diana (n=3; linfocitos T CD19-ENG frente a linfocitos T EphA2-ENG para Daudi y Raji: p<0,05; linfocitos T CD19-ENG frente a linfocitos T EphA2-ENG para BV173: p= NS).

La **FIG. 8** demuestra que los linfocitos T que secretan acopladores de linfocitos T específicos de CD123 reconocen células tumorales positivas en CD123 de una forma específica de antígeno. **(A)** Esquema de vectores de retrovirus que codifican acopladores específicos de CD123 y análisis de FACS de linfocitos T transducidos. **(B)** Análisis FACS de células AML positivas en CD123 (THP-1 y KG1a) y negativas (Jurkat) y control positivo (Jurkat CD123). **(C)** Ensayo de cocultivo de efectores específicos de CD19, CD123(292) o CD123(716) con células diana positivo para CD123 (KG1a, Jurkat-CD123) y células diana negativas para CD123 (Jurkat). El IFN $\gamma$  se determinó tras 24 horas. **(D)** Ensayo de citotoxicidad usando efectores específicos de CD19, CD123(292) o CD123(716) y células diana positivas para CD123 (KG1a).

La **FIG. 9** demuestra que los linfocitos T que secretan acopladores de linfocitos T específicos de LeY eliminan células tumorales positivas en LeY de una forma específica de antígeno. El ensayo de citotoxicidad convencional se realizó con linfocitos T LeY-ENG y linfocitos T CD19-ENG como efectores y K562(CD19-, LeY-) y KG1a (CD19-, LeY+) células diana.

La **FIG. 10** demuestra que los linfocitos T que secretan acopladores de linfocitos T específicos de B7H3 reconocen células tumorales positivas en B7H3 de una forma específica de antígeno. **(A)** Ensayo de cocultivo de linfocitos T B7H3-ENG o de linfocitos T CD19-ENG con células tumorales positivas para B7H3 (U373, LM7, CHLA255) y negativas para B7H3 (HTB119). Tras 24 horas, se determinó IFN $\gamma$ . **(B)** Ensayo de cocultivo de linfocitos T B7H3-ENG o linfocitos T CD19-ENG con U373, LM7, CHLA255. Las células tumorales viables se visualizaron mediante tinción con cristal violeta.

La **FIG. 11** demuestra que los linfocitos T que secretan acopladores de linfocitos T específicos de HER2 reconocen células tumorales positivas en HER2 de una forma específica de antígeno. Los linfocitos T HER2-ENG o linfocitos T no transducidos (NT) se cocultivaron con células tumorales positivas en HER2 (U373) y negativas en HER2 (MDA). Tras 24 horas, se determinó IFN $\gamma$ .

La **FIG. 12** demuestra que los linfocitos T que secretan acopladores de linfocitos T que son específicos para el epítipo conformacional de EGFR 806 reconoce células tumorales positivas en EGFR de una forma específica de antígeno. Los linfocitos T 806-ENG y los linfocitos T CD19-ENG se incubaron con U373 (EGFR bajo positivo), A431(con el gen amplificado de EGFR), K562 (EGFR negativo), y K562 modificado genéticamente para expresar EGFRvIII (K562-EGFRvIII). Tras 24 horas, se determinó IFN $\gamma$ .

La **FIG. 13** demuestra que los linfocitos T que secretan acopladores de células NK específicos de EphA2 activan las células NK de una forma específica de antígeno. **(A)** Esquema de vectores de retrovirus que codifican un acoplador de célula NK específico de EphA2. **(B)** Ensayo de cocultivo de células NK, linfocitos T CD16.EphA2-ENG o linfocitos T CD16.EphA2-ENG más células NK en placas recubiertas con IL13R $\alpha$ 2 o EphA2. Solo los cocultivos de linfocitos T CD16.EphA2-ENG más las células NK en presencia de EphA2 produjeron altos niveles de IFN $\gamma$ , lo que demuestra la activación específica de antígeno de células NK.

La **FIG. 14** demuestra que los linfocitos T EphA2-ENG redirigen los linfocitos T espectadores hacia las células tumorales. **(A)** Las células A549 se cocultivaron con o sin linfocitos T NT y el medio de los linfocitos T NT o los linfocitos T EphA2-ENG. Después de 24 horas, se determinó la producción de IFN- $\gamma$  mediante ELISA (media  $\pm$  DT; n=4). **(B)** Esquema de ensayos de cocultivo transpocillo. **(C)** Los linfocitos T NT y las células U373 se colocaron en el pocillo inferior, y los linfocitos T EphA2-ENG en el pocillo de inserción. El número de linfocitos T EphA2-ENG varió de  $10^3$  a  $10^6$ . Los linfocitos T CD19-ENG en el pocillo de inserción y en los pocillos inferiores sin linfocitos T NT sirvieron como controles. Después de 48 horas, las células U373 vivas se visualizaron mediante tinción con cristal violeta. Se muestran los resultados de un experimento representativo. **(D)** Para comparar la actividad antitumoral de los linfocitos T EphA2-ENG o EphA2-CAR, se incubaron las células U373 con  $1 \times 10^5$  linfocitos T que contienen porcentajes en aumento de linfocitos T EphA2-ENG o EphA2-CAR transducidos. Tras 48 horas, las células tumorales viables se midieron mediante ensayo MTS (n=4; ensayo por triplicado para cada donante; p<0,00001).

La **FIG. 15** demuestra que los linfocitos T CD19-ENG redirigen los linfocitos T espectadores hacia las células tumorales. Los linfocitos T no transducidos (NT), EphA2-ENG o CD19-ENG se colocaron en el pocillo de inserción y la luciferasa de luciérnaga (fLuc)-BV713 o fLuc-BV173 y los linfocitos T NT se colocaron en el pocillo inferior. Tras 48 horas se determinó la presencia de células tumorales mediante ensayo de luc. Solo los linfocitos

T CD19-ENG redirigieron los linfocitos T NT hacia las células tumorales (n=3; P<0,05).

La **FIG. 16** demuestra que la activación específica de antígeno de los linfocitos T EphA2-ENG mejora su capacidad para redirigir los linfocitos T espectadores hacia las células tumorales. **(A,B)** Los linfocitos T NT y EphA2-ENG se cultivaron en placas recubiertas de EphA2 (activado) o HER2 (no activado). Las placas tratadas con PBS sirvieron como controles. **(A)** Después de 72 horas, la expresión de EphA2-ENG se determinó mediante qRT-PCR (media + DT; n=3). **(B)** La producción de IFN $\gamma$  se determinó mediante ELISA tras 24 horas (media + DT; n=3). **(C)** Las células U373.eGFP.ffLuc o BV173.ffLuc se cocultivaron con linfocitos T NT y números en aumento de linfocitos T EphA2-ENG activados o no activados separados en transpocillo. Después de 48 horas, Las células tumorales vivas se determinaron mediante el ensayo de la luciferasa (n=3; ensayo por duplicado para cada donante; linfocitos T activados frente a no activados: para U373: p<0,00001; para BV173: p = 0,12).

La **FIG. 17** demuestra la expansión dependiente de antígeno de los linfocitos T EphA2-ENG y los linfocitos T espectadores *in vivo*. **(A)** Los ratones portadores o no portadores del tumor A549 recibieron una inyección i.v. de una mezcla de  $5 \times 10^6$  linfocitos T EphA2-ENG que expresan eGFP.ffLuc y  $5 \times 10^6$  linfocitos T NT, y una dosis i.p. de IL2 (1.500 unidades). Se realizó la obtención de imágenes seriadas de bioluminiscencia para seguir los linfocitos T (se muestran las medias +/- DT; n=5 por grupo; \* p < 0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,005). **(B)** Los ratones portadores del tumor A549 recibieron una inyección i.v. de una mezcla de  $5 \times 10^6$  linfocitos T EphA2-ENG y  $5 \times 10^6$  linfocitos T NT que expresan eGFP.ffLuc o  $5 \times 10^6$  linfocitos T CD19-ENG t  $5 \times 10^6$  linfocitos T NT que expresan eGFP.ffLuc, y una dosis i.p. de IL2 (1.500 unidades). Se realizó la obtención de imágenes seriadas de bioluminiscencia para seguir los linfocitos T.

La **FIG. 18** describe los esquemas experimentales de los modelos animales en los que se ensayaron los linfocitos T EphA2-ENG y CD19-ENG.

La **FIG. 19** demuestra que los linfocitos T EphA2-ENG tiene una potente actividad antitumoral *in vivo*. **(A-C)** Actividad antitumoral de los linfocitos T EphA2-ENG en el modelo de xenoinjerto SCID de glioma U373. Siete días después de la inyección intracraneal de  $1 \times 10^5$  células U373.eGFP.ffLuc, se inyectaron por vía intracraneal  $2 \times 10^6$  linfocitos T EphA2-ENG (n=8) o CD19-ENG (n=5) en el mismo sitio. Los animales no tratados sirvieron como controles (n=5). El crecimiento tumoral se siguió mediante imágenes de bioluminiscencia. **(A)** Imágenes de animales representativos; **(B)** Resultados cuantitativos de imágenes de bioluminiscencia para cada ratón (radiancia=fotones/seg/cm<sup>2</sup>/sr) a lo largo del tiempo; **(C)** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier. **(D-F)** Actividad antitumoral de los linfocitos T EphA2-ENG en el modelo de xenoinjerto SCID de tumor de pulmón A549. Siete, 14 y 21 días después de la inyección i.v. de  $2,5 \times 10^6$  células A549.eGFP.ffLuc, los ratones recibieron una dosis i.v. de  $1 \times 10^7$  linfocitos T EphA2-ENG (n=5) o linfocitos T CD19-ENG (n=4) y una dosis i.p. de IL2 (1.500 unidades). Los animales no tratados sirvieron como controles (n=5). El crecimiento tumoral se siguió mediante imágenes de bioluminiscencia. **(D)** Imágenes de animales representativos; **(E)** Resultados cuantitativos de imágenes de bioluminiscencia para cada ratón; **(F)** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier.

La **FIG. 20** demuestra que los linfocitos T CD19-ENG tienen una potente actividad antitumoral en un modelo de xenoinjerto de leucemia. Las células BV173.ffLuc se inyectaron por vía i.v. en el día 0, y en el día 7, 14, 21 los ratones recibieron  $1 \times 10^7$  linfocitos T EphA2-ENG (n=5) o linfocitos T CD19-ENG (n=5) por vía i.v. con una dosis i.p. de IL2. Los animales no tratados sirvieron como controles (n=5). **(A)** Imágenes representativas, **(B)** Bioluminiscencia cuantitativa.

La **FIG. 21** demuestra que los linfocitos T CD19-ENG tienen una potente actividad antitumoral en un modelo de xenoinjerto de linfoma. Se inyectaron células Daudi.ffLuc por vía i.v. en el día 0, y en el día 3, 6, 9 los ratones recibieron  $1 \times 10^7$  linfocitos T CD19-ENG (n=5) o linfocitos T no transducidos (NT) (n=5) por vía i.v. **(A)** Imágenes representativas, **(B)** Bioluminiscencia cuantitativa.

La **FIG. 22** demuestra que los linfocitos T que expresan una molécula de acoplador específica de CD19 y las moléculas coestimuladoras CD80 y 4-1BBL producen de forma consistente IL-2 en ensayos de cocultivo. **(A)** Esquema de vectores de retrovirus usados y linfocitos T CD19-ENG/coestim. **(B)** Expresión de CD80 y 4-1BBL en linfocitos T CD19-ENG y CD19-ENG/coestim; n = 4. **(C)** Producción consistente de IL-2 tras la estimulación con BV173 (CD80-/CD86-) de linfocitos T CD19-ENG/Coestim; n = 2. No se observó producción de IL-2 con linfocitos T Coestim que expresan una molécula de acoplador irrelevante (linfocitos T EphA2-ENG/Coestim), lo que confirma la secreción de IL-2 específica de antígeno.

La **FIG. 23** demuestra que los linfocitos T que se modifican genéticamente con vectores de retrovirus que codifican un EphA2-ENG e IL15 no solo expresan IFN $\gamma$  e IL2 tras la activación, sino también un elevado nivel de IL15. Los linfocitos T NT, los linfocitos T CD19-ENG, los linfocitos T EphA2-ENG o los linfocitos T EphA2-ENG/IL15 se cocultivaron con células positivas en EphA2/negativas en CD19 (U373, A549, K562-EphA2), células negativas en EphA2/negativas en CD19 (K562) o negativas en EphA2/positivas en CD19 (BV173). Después de 24 horas, se determinó la producción de IFN $\gamma$  **(A)**, IL2 **(B)** e IL15 **(B)** mediante ELISA (n=4).

La **FIG. 24** demuestra que los linfocitos T que se modifican genéticamente con vectores de retrovirus que

codifican un EphA2-ENG e IL15 tienen un mayor potencial proliferativo que los linfocitos T que solo se modifican con EphA2-ENG. Los linfocitos T NT, CD19-ENG, EphA2-ENG, y los linfocitos T EphA2/IL15 se cocultivaron con células tumorales positivas en EphA2 (U373, A549) (**B,C**) en una proporción de 10:1 o medio (**A**). Después de 7 días, se contó el número de linfocitos T viables mediante tinción con azul tripán (U373: EphA2-ENG frente a EphA2-ENG/IL15  $p=0,01$ ; A549: EphA2-ENG frente a EphA2-ENG/IL15  $p=0,008$ ;  $n=4$ ).

### Descripción detallada de la invención

Tal como se usa en el presente documento, las palabras "un" y "una" cuando se usan en la presente memoria descriptiva en concierto con la palabra que comprende, incluyendo las reivindicaciones, denotan "uno o más". Algunos aspectos descritos en el presente documento pueden consistir en o consistir esencialmente en uno o más elementos, etapas del método, y/o métodos de la invención. Se contempla que cualquier método o composición descrita en el presente documento se pueda implementar con respecto a cualquier otro método o composición descrita en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, el término "acoplador" o "molécula de acoplador" se refiere a una molécula que se secreta a partir de una célula que activa las células inmunológicas. En realizaciones particulares, el acoplador activa las células inmunológicas específicas de acuerdo con los dominios presentes en el acoplador. Los ejemplos ilustrativos de células que secretan acopladores, pero sin limitación, incluyen linfocitos T, células NK, células NKT, linfocitos T CAR, células madre mesenquimales (MSC), células madre neuronales, células madre hematopoyéticas, o una mezcla de las mismas, en algunos casos.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "dominio de reconocimiento de antígeno" se refiere a una parte de la molécula de acoplador que reconoce un antígeno. En aspectos particulares descritos en el presente documento, los antígenos pueden ser de cualquier naturaleza, incluyendo, pero sin limitación, proteínas, carbohidratos y/o moléculas sintéticas.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "dominio de activación" se refiere a una parte de las moléculas de acopladores que interactúa con las células inmunológicas e induce una señal inmunomoduladora positiva o negativa. Los ejemplos ilustrativos de señales inmunomoduladoras positivas incluyen señales que inducen la proliferación celular, secreción de citocinas o actividad citolítica. Los ejemplos ilustrativos de señales inmunomoduladoras negativas incluyen señales que inhiben la proliferación celular, inhiben la secreción de factores inmunosupresores, o inducen la muerte celular.

Tal como se usa en el presente documento, el término "célula inmunológica natural" se refiere a una célula inmunológica que se da de forma natural en el sistema inmunológico. Los ejemplos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, linfocitos T, células NK, células NKT, linfocitos B y células dendríticas.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "célula inmunológica diseñada genéticamente" se refiere a una célula inmunológica que se modifica genéticamente.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "dominio coestimulador" o "dominio de señalización coestimulador" se refiere a un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora. En aspectos particulares, se refiere a un dominio que proporciona señales adicionales a la célula inmunológica en conjunto con un dominio de activación. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de superficie celular que no son receptores de antígeno o receptores Fc que proporcionan una segunda señal requerida para la activación y el funcionamiento eficaz de los linfocitos T tras la unión al antígeno. Los ejemplos ilustrativos de tales moléculas coestimuladoras incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, ICOS (CD278), LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKD2C, CD70, CD80, CD86 y CD83.

### I. MOLÉCULAS DE ACOPLADOR

En realizaciones particulares, las células se modifican genéticamente (incluyendo las células inmunológicas) con moléculas de acoplador que comprenden al menos un dominio de reconocimiento de antígeno y un dominio de activación y, opcionalmente, una citocina, un dominio coestimulador y/o un dominio para la inhibición de moléculas reguladoras negativas de la activación de linfocitos T. El dominio de reconocimiento de antígeno de la molécula de acoplador se une a una o más moléculas presentes en y/o sobre células diana o que se secreta por las células diana. En aspectos específicos, las células diana son células cancerosas, incluyendo al menos células de tumores sólidos. Una vez que las moléculas del acoplador se han unido a la molécula diana, pueden activar células que expresan la molécula reconocida por el dominio de activación. Las moléculas de acoplador pueden activar células que se modifican genéticamente con moléculas de acoplador o pueden activar células no modificadas. En función del efecto deseado, la activación puede dar como resultado una señal positiva o negativa. Los ejemplos de señales positivas incluyen señales que inducen la proliferación celular, secreción de citocinas o actividad citolítica. Los ejemplos de señales negativas incluyen señales que inhiben la proliferación de linfocitos T, inhiben la secreción de factores inmunosupresores, o inducen la muerte celular.

En aspectos particulares, las células inmunológicas que secretan moléculas de acopladores son capaces de redirigir las células inmunológicas residentes (naturalmente endógenas para un individuo específico) hacia las células cancerosas.

5 Los aspectos de la divulgación proporcionan la administración de células inmunológicas modificadas que secretan una molécula de acoplador a un individuo que lo necesite (del que se sabe que tiene cáncer o se sospecha que tiene cáncer, incluyendo un cáncer particular) con contraste con la administración solo de la molécula de acoplador al propio individuo (en ausencia de ser producida por células inmunológicas modificadas). En la presente divulgación, el individuo recibe las células inmunológicas modificadas que permiten la producción de la(s) molécula(s) de acoplador. En aspectos particulares, las células producen citocinas inmunoestimuladoras; proliferan de una manera específica de antígeno; eliminan las células diana apropiadas; redirigen células inmunológicas espectadoras (que incluyen al menos linfocitos T o células NK) hacia células cancerosas; secretan moléculas de acoplador tras la activación; y/o son eficaces contra el cáncer de forma locorregional o sistémica. La FIG. 3 representa ejemplos de linfocitos T o células NK modificados que secretan moléculas de acopladores. Aunque un linfocito T o una célula NK en particular puede producir un acoplador que puede dirigirse al mismo antígeno específico de células cancerosas, los dominios de activación para un linfocito T o una célula NK deben ser diferentes, dado que las células NK no expresan CD3. Los ejemplos de activación para una célula NK incluyen al menos CD16, NKG2D o NKp30, por ejemplo.

20 En diversos aspectos descritos en el presente documento, los métodos y las composiciones se refieren a las composiciones que comprenden una construcción de anticuerpos de cadena simple biespecíficos o a construcciones biespecíficas que tienen ligandos, péptidos o TCR solubles como dominios de reconocimiento de antígeno y/o ligandos como dominios de activación de células inmunológicas en lugar de fragmentos derivados de anticuerpos (**FIG. 3**). La construcción de anticuerpo de cadena simple biespecífico se caracteriza por comprender o consistir en o consistir esencialmente en al menos dos dominios, mediante los cuales uno de dicho al menos dos dominios se une de manera específica a un antígeno tumoral enumerado en la **Tabla 1**, por ejemplo (EphA2, CD19, CD123, LeY, B7H3, HER2 y EGFR, (incluyendo EGFRvIII), y un segundo dominio se une a una proteína de superficie de célula inmunológica, tal como CD3 en linfocitos T, por ejemplo. Además, una molécula de acoplador puede comprender tres o más dominios. Los aspectos descritos en el presente documento abarcan adicionalmente un proceso para la producción de la composición de la divulgación, un método para la prevención, el tratamiento o la mejora del cáncer, y el uso de una construcción de una molécula de acoplador biespecífica en la prevención, el tratamiento o la mejora del cáncer o al menos un síntoma del mismo.

35 En algunos aspectos descritos en el presente documento, las composiciones de acoplador comprenden una construcción de anticuerpo de cadena simple biespecífico además de un tercer dominio (aunque en algunos casos, se pueden añadir más dominios), que se pueden citar como un acoplador tripartito. El tercer o más dominio puede mejorar la actividad de la composición o el método, tal como proporcionando una citocina, un dominio coestimulador y/o un dominio para la inhibición de moléculas reguladoras negativas de la activación de linfocitos T. Los aspectos descritos en el presente documento abarcan adicionalmente un proceso para la producción del acoplador tripartito, un método para la prevención, el tratamiento o la mejora del cáncer, y el uso de un acoplador tripartito en la prevención, el tratamiento o la mejora del cáncer.

45 En realizaciones particulares, una molécula de acoplador comprende un dominio de reconocimiento de antígeno que se une a EphA2. EphA2 se puede citar como el receptor A2 de EPH (receptor 2 de efrina de tipo A; EPHA2; ARCC2; CTPA; CTPP1; o ECK), que es una proteína que en seres humanos está codificada por el gen EPHA2 en la subfamilia del receptor de efrina de la familia de la proteína tirosina cinasa. Los receptores en esta subfamilia generalmente comprenden un único dominio cinasa y una región extracelular que comprende un dominio rico en Cys y 2 repeticiones de fibronectina de tipo III; las realizaciones de los anticuerpos de la divulgación se pueden dirigir a cualquiera de estos dominios. Los receptores de efrina se dividen en dos grupos como resultado de la similitud de sus respectivas secuencias de dominio extracelular y también de sus afinidades de unión a los ligandos de efrina A y efrina B y EphA2 codifica una proteína que se une a los ligandos de efrina A. Una secuencia de ácido nucleico ejemplar de EphA2 humana es la del N.º de registro de GenBank® NM\_004431, y una secuencia de polipéptido ejemplar de EphA2 humana es la del N.º de registro de GenBank® NP\_004422.

55 En realizaciones particulares, una molécula de acoplador comprende un dominio de reconocimiento de antígeno que se une a CD19. CD19 se puede citar como molécula de CD19, antígeno CD19, antígeno de diferenciación CD19, antígeno B4 de superficie de linfocito B, CVID3. Se puede encontrar información en relación con el locus del gen, las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos en HGNC: 1633, Entrez Gene: 930, Ensembl: ENSG00000177455, UniProtKB: P15391. CD19 codifica una molécula de superficie celular, que se ensambla con el receptor de antígeno de linfocitos B con el fin de disminuir el umbral de estimulación dependiente del receptor de antígeno. Una molécula ejemplar de CD19 humana es la del N.º de registro de GenBank® NM\_001178098, y un polipéptido ejemplar de CD19 humana es la del N.º de registro de GenBank® NP\_001171569.

65 Las células de acoplamiento se pueden generar mediante cualquier método adecuado en la materia. En realizaciones específicas, los linfocitos T de acoplamiento se generan mediante transducción vírica de linfocitos T, aunque en al menos determinados casos también es útil la transducción vírica de células NK y otras células

(linfocitos T CAR, células NKT, MSC, células madre neuronales, células madre hematopoyéticas, en algunos casos) en algunos aspectos descritos en el presente documento. El TCR natural endógeno de los linfocitos T transducidos pueden ser o bien inespecíficos o específicos para un antígeno, tal como un antígeno tumoral o un antígeno vírico.

**5 A. Dominio de reconocimiento de antígeno**

Las composiciones del acoplador de la divulgación incluyen un dominio de reconocimiento de antígeno que permite a los linfocitos T que expresan el acoplador y a la correspondiente molécula de acoplador dirigirse a una célula particular de interés que expresa el antígeno o dirigirse a un antígeno secretable. En aspectos particulares, cualquier célula puede comprender el antígeno, pero en aspectos específicos, el antígeno se presenta sobre una célula cancerosa, incluyendo una célula de tumor sólido. El antígeno de célula cancerosa puede ser de cualquier tipo, pero en aspectos particulares es específico para una célula cancerosa y puede ser específico para un tipo particular de célula cancerosa. Por ejemplo, en realizaciones en las que se utiliza EphA2, la célula cancerosa puede ser de cáncer de mama, de pulmón, de próstata o de glioblastoma. La célula también puede ser una célula patógena, tal como una célula bacteriana.

Se puede direccionar cualquier antígeno de cáncer mediante los linfocitos T que expresan acoplador descritos en el presente documento o las correspondientes moléculas de acoplador de los mismos. En aspectos específicos, los antígenos se enumeran en la Tabla 1. En aspectos particulares, la molécula de acoplador comprende más de un dominio de reconocimiento de antígeno.

Cuando se direcciona un particular antígeno de cáncer, el antígeno se puede direccionar con cualquier scFv adecuado o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo. Los ejemplos de scFv particulares, que se usaron para construir moléculas de acoplador se enumeran en la Tabla 2. Se confirmó la funcionalidad de los linfocitos T que expresan las respectivas moléculas de acoplador, y se describe en detalle en el EJEMPLO 2.

**Tabla 2: scFV usados para la construcción de moléculas de acoplador**

Diana	MAb
CD19	FMC63
CD123	26292
CD123	32716
LeY	Hu3S193
EphA2	4H5
B7H3	8H9
HER2	FRP5
EGFR que incluye EGFRVIII	806

Otros posibles antígenos se enumeran en la **Tabla 1** y/o se tratan en otra parte en el presente documento.

**B. Dominio de activación**

Las composiciones del acoplador de la divulgación incluyen un dominio de activación que permite que la célula inmunológica que expresa la molécula de acoplador y/u otras células inmunológicas se unan al acoplador a una célula diana. El dominio de activación es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en aspectos particulares. Los ejemplos ilustrativos de dominios de activación incluyen, pero sin limitación, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, ligandos, péptidos, receptores solubles de linfocitos T o combinaciones de los mismos.

La célula inmunológica a la que se une el acoplador puede ser una célula inmunológica natural no modificada endógena (para el sujeto receptor), o puede ser una célula inmunológica modificada genéticamente. La unión del acoplador a la célula inmunológica diana a través del dominio de activación (tal como un anticuerpo monoclonal CD3 en el caso de los linfocitos T), activa de este modo la célula inmunológica diana. Otras moléculas de activación que se pueden direccionar fácilmente con acopladores incluyen moléculas coestimuladoras tales como CD27, CD28, CD134 y CD137. Por ejemplo, los linfocitos T se pueden diseñar genéticamente para que expresen una molécula de acoplador con un dominio de reconocimiento de antígeno específico de EphA2 y un dominio de activación específico de CD3, y otro acoplador con un dominio de reconocimiento de antígeno específico de HER2 y un dominio de activación específico de CD28. Estos linfocitos T de acoplamiento solo se activarían por completo en los sitios del tumor en los que se expresan ambos antígenos. Cuando el acoplador es para dirigir células NK, el dominio de activación puede comprender un anticuerpo que reconoce CD 16 (tal como el anticuerpo NM3E2), o ligandos

específicos para NKG2D (ULBP2) o NKp30 (B7H6). En realizaciones específicas, el dominio de activación comprende ligandos, receptores, péptidos, etc.

### C. Dominios adicionales opcionales

5 En realizaciones particulares, un acoplador comprende un dominio adicional que mejora la actividad del acoplador y/o mejora la actividad de la célula inmunológica que expresa la molécula del acoplador. Aunque un dominio adicional puede ser de cualquier tipo, en realizaciones específicas, el dominio adicional comprende uno o más dominios de reconocimiento de antígeno o uno o más dominios de activación. El dominio adicional puede comprender una citocina, un dominio coestimulador o una entidad que inhibe las moléculas reguladoras negativas de la activación de linfocitos T. En algunas realizaciones, solo se emplea un dominio adicional en moléculas del acoplador, pero en otras realizaciones se puede emplear más de uno, incluyendo más de uno del mismo tipo o diferente.

15 Los dominios adicionales podrían compensar el escape inmunológico dirigiéndose a un antígeno adicional. Por ejemplo, se podría diseñar una molécula de acoplador para dirigirse a CD19 y a CD22 para las neoplasias sanguíneas o a EphA2 y HER2 para los tumores sólidos. Los dominios adicionales también podrían proporcionar coestimulación. Por ejemplo, se podría diseñar una molécula de acoplador que se dirija al antígeno del tumor (véase la Tabla 1), y que contenga un scFv específico de CD3 para la activación de linfocitos T y el dominio extracelular de 41BBL para proporcionar coestimulación. Un dominio adicional podría atraer células inmunológicas. Por ejemplo, se podría usar un dominio adicional que codifica la quimiocina RANTES para aumentar el tráfico de células inmunológicas hacia los sitios del tumor. También se podría usar un dominio adicional para proporcionar un factor de crecimiento de células inmunológicas tal como una citocina. Por ejemplo, se podría usar un dominio adicional que codifica citocinas como IL-2 o IL15 para mejorar la proliferación y la expansión de células inmunológicas. También se podría usar un dominio adicional para cambiar las propiedades físicas de la molécula de acoplador. Por ejemplo, un dominio adicional que codifica un dominio CH2-CH3 o una cremallera de leucina podría promover la dimerización o la trimerización de la molécula de acoplador, dando como resultado una función mejorada.

30 En realizaciones particulares, el dominio adicional codifica cualquier citocina. En aspectos específicos, la citocina puede ser IL-2, IL-7 y/o IL-15, y en algunos aspectos, el acoplador comprende más de un dominio adicional que codifica citocinas.

35 En realizaciones particulares, un acoplador comprende un dominio coestimulador tal como se describe en alguna parte del presente documento. En realizaciones particulares, sin embargo, el dominio coestimulador comprende CD80, CD137 y similares.

En aspectos particulares, la molécula de acoplador comprende un dominio que inhibe moléculas reguladoras negativas de la activación de linfocitos T. En aspectos específicos, el dominio es PD-L1 o CTLA4, por ejemplo.

### 40 D. Dominio de receptor soluble de linfocitos T

En algunos aspectos descritos en el presente documento, en lugar de que un dominio de reconocimiento de antígeno sea un anticuerpo, un acoplador comprende un diferente tipo de dominio que no es un anticuerpo pero que es capaz de reconocer una célula cancerosa. En un aspecto, el acoplador comprende un miembro de un par de unión ligando-receptor, en donde el miembro relacionado se expresa en la célula cancerosa. En determinados aspectos, el acoplador comprende un dominio de receptor soluble de linfocitos T (TCR), en lugar de un anticuerpo. La FIG. 2 representa una realización ejemplar con un dominio de activación de linfocitos T unido a un TCR soluble.

### 50 E. Ejemplos de moléculas específicas de acopladores

A continuación se proporcionan ejemplos específicos de moléculas de acopladores. En general, un scFv contienen un dominio VH y un dominio VL conectados mediante un péptido enlazador. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 es un acoplador de linfocito T CD19-CD3 que comprende la siguiente fórmula:

#### 55 1. Acoplador de linfocitos T CD19-CD3

Líder-VL FMC63-(G4S1)3-VH FMC63-SG4S-VHOKT3-(G4S1)3-VLOKT3

60 La SEQ ID NO:1 es tal como sigue, en donde la primera sección subrayada es la secuencia líder y las siguientes secciones subrayadas son secuencias de enlazadores entre los respectivos scFv, de acuerdo con la fórmula anterior:

MDWIWRILFLVGAATGAHSDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQK  
PDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGG  
GTKLELKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQQSGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL  
PDYGVSWIRQPPRKLEWLGVWVWSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD  
DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTTVTVSSYVTVSSSGGGGSDIKLQQSGAELAR  
PGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL  
TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGG  
GSGGGGSDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTS  
KVASGVPYRFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKS

**2. Acoplador de linfocitos T IL3Ra-CD3**

5 Líder-VH26292-(G4S1)3-VL26292-SG4S-VHOKT3-(G4S1)3-VLOKT3

La SEQ ID NO:2 es tal como sigue, en donde la primera sección subrayada es la secuencia líder y las siguientes secciones subrayadas son secuencias de enlazadores entre los respectivos scFv de acuerdo con la fórmula anterior:

MDWIWRILFLVGAATGAHSQVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWV  
KQRPDQGLEWIGRIDPYDSETHYNQKFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC  
ARGNWDDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDVQITQSPSYLAASPGETITINC  
RASKSISKDLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAM  
YYCQQHNKYPYTFGGGKLEIKSGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTF  
RYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLT  
EDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPAI  
MSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGT  
10 SYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKS

**3. Acoplador de linfocitos T IL3Ra-CD3**

15 Líder-VH32716-(G4S1)3-VL32716-SG4S-VHOKT3-(G4S1)3-VLOKT3

La SEQ ID NO:3 es tal como sigue, en donde la primera sección subrayada es la secuencia líder y las siguientes secciones subrayadas son secuencias de enlazadores entre los respectivos scFv de acuerdo con la fórmula anterior:

MDWIWRILFLVGAATGAHSQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFTNYGMNWVK  
QAPGKSFKWMGWINTYTGESTYSADFKGRFAFSLETSASTAYLHINDLKNETATYFCA  
RSGGYDPMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSLGQRATI  
SCRASESVDNYGNTFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINP  
VEADDVATYYCQQSNEDPPTFGAGTKLELKSGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSC  
KTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNPKFKDKATLTDDKSSSTAY  
MQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSDI  
QLTQSPAIMASAPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYR  
FSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKS

**4. Acoplador de linfocitos T Le Y-CD3**

5 Líder-VHHu3S193-(G4S1)3-VLHu3S193-SG4S-VHOKT3-(G4S1)3-VLOKT3

La SEQ ID NO:4 es tal como sigue, en donde la primera sección subrayada es la secuencia líder y las siguientes secciones subrayadas son secuencias de enlazadores entre los respectivos scFv de acuerdo con la fórmula anterior:

MDWIWRILFLVGAATGAHSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSTSGFTFSDYYMYWVR  
QAPGKGLEWVAYMSNVGAITDYPDTVKGRTISRDNKNTLFLQMDSLRLPEDTGVYFC  
ARGTRDGSWFAYWGQGTPTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGR  
VTITCRSSQRIVHSNGNTYLEWYQQTPGKAPKLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTFT  
ISSLQPEDIATYYCFQGSHPFTFGQGTKLQITSGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMS  
CKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNPKFKDKATLTDDKSSSTA  
YMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSD  
IQLTQSPAIMASAPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYR  
FSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKS

10

**5. Acoplador de linfocitos T EphA2-CD3**

Líder-VH4H5-(G4S1)3-VL4H5-SG4S-VHOKT3-(G4S1)3-VLOKT3

15

La SEQ ID NO:5 es tal como sigue, en donde la primera sección subrayada es la secuencia líder y las siguientes secciones subrayadas son secuencias de enlazadores entre los respectivos scFv de acuerdo con la fórmula anterior:

MDWIWRILFLVGAATGAHSQVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVR  
QAPGQALEWMGTISSGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC  
AREAIFTYWGRGTLVTSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCKAS  
QDINNYLSWYQQKPGQAPRLLIYRANRLVDGVPDRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAY  
YFCLKYDVPFYTFGQGTKVEIKSGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTR  
YTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSE  
DSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPAIM  
SASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTS  
YSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKS

**6. Acoplador de linfocitos T B7H3-CD3**

5 Líder-VH8H9-(G4S1)3-VL8H9-SG4S-VHOKT3-(G4S1)3-VLOKT3

La SEQ ID NO:6 es tal como sigue, en donde la primera sección subrayada es la secuencia líder y las siguientes secciones subrayadas son secuencias de enlazadores entre los respectivos scFv de acuerdo con la fórmula anterior:

MDWIWRILFLVGAATGAHSQVKLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWV  
RQRPEQGLEWIGWIFPGDGSTQYNEKFKGKATLTTDTSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFC  
ARQTTATWFAYWGQGTTVTVSSDGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPTTLSVTPGDRVS  
LSCRASQSIDYHLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPED  
VGVYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELKQAASSGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKT  
SGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYM  
QLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQL  
TQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFS  
10 GSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKS

**7. Acoplador de linfocitos T HER2-CD3**

15 Líder-VHFRP5-(G4S1)3-VLFRP5-G4S-VHOKT3-(G4S1)3-VLOKT3

La SEQ ID NO:7 es tal como sigue, en donde la primera sección subrayada es la secuencia líder y las siguientes secciones subrayadas son secuencias de enlazadores entre los respectivos scFv de acuerdo con la fórmula anterior:

MDWIWRILFLVGAATGAHSEVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYPTNYGMNWV  
KQAPGQGLKWMGWINTSTGESTFADDFKGRFDFSLETSANTAYLQINNPKSEDMATYF  
CARWEVYHGYVPYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSHKFLSTSVGD  
RVSITCKASQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYTGVPSRFTGSGSGPDTFTISS  
VQAEDLAVYFCQQHFRTPTFGSGTKLEIKALGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSC  
KTSGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAY  
MQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDI  
QLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYR  
FSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKS

**8. Acoplador de linfocitos T EGFR-CD3**

5 Líder-VH806-(G4S1)3-VL806-SG4S-VHOKT3-(G4S1)3-VLOKT3

La SEQ ID NO:8 es tal como sigue, en donde la primera sección subrayada es la secuencia líder y las siguientes secciones subrayadas son secuencias de enlazadores entre los respectivos scFv de acuerdo con la fórmula anterior:

MDWIWRILFLVGAATGAHSDVQLQESGPSLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDFAWNWIR  
QFPGNKLEWMGYISYSGNTRYNPSLKSRSITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTA  
GRGFPYWGQGTLVTVSAGGGGGSGGGGSGGGGSDILMTQSPSSMSVSLGDTVSIATCHSS  
QDINSNIGWLQQRPGKSFKGLIYHGNTLDDEVPSRFSGSGSGADYSLTISSLESEDFADY  
YCVQYAQFPWTFGGGKLEIKRSGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFT  
RYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTS  
EDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPAI  
MSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGT  
10 SYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKS

**9. Acoplador de células NK CD16-EphA2**

15 Líder-VHNM3E2-(G4S1)3-VLNM3E2-SG4S-VH4H5-(G4S1)3-VL4H5

La SEQ ID NO:9 es tal como sigue, en donde la primera sección subrayada es la secuencia líder y las siguientes secciones subrayadas son secuencias de enlazadores entre los respectivos scFv de acuerdo con la fórmula anterior:

MDWIWRILFLVGAATGAHSEVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWV  
 RQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY  
 YCARGRSLFDYWGQGLTVTVSRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSSELTQDPAVSA  
 LGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLYYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLT  
 ITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVGSGGGGSQVQLLESGGGLVQPGG  
 SLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGQALEWMGTISSGGTYTYYPDSVKGRFTISRDN  
 KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREAIFTYWGRGTLVTSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ  
 LTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINNYLSWYQQKPGQAPRLLIYRANRLVDGVPDRFS  
 GSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFCLKYDVFYPYTFGQGTKVEIK

#### F. Acopladores - Conceptos generales

- 5 La expresión "construcción de anticuerpo de cadena simple biespecífico" se refiere a una construcción que comprende dos dominios de unión que derivan de anticuerpos. Uno de los dominios de unión puede comprender regiones variables (o partes de las mismas) de un anticuerpo, del fragmento del anticuerpo o derivados de los mismos, capaces de unirse específicamente a/interaccionar con un antígeno diana, por ejemplo, EphA2 o CD19. El segundo dominio de unión puede comprender regiones variables (o partes de las mismas) de un anticuerpo, del fragmento del anticuerpo o derivados de los mismos, capaces de unirse específicamente a/interaccionar con una molécula de activación, por ejemplo, un antígeno CD3 humano. En realizaciones específicas, una parte de una región variable comprende al menos una CDR ("región determinante de complementariedad"), tal como al menos una región CDR1, CDR2 o CDR3. Los dos dominios/regiones en la construcción de anticuerpo de cadena simple preferentemente están unidos covalentemente entre sí como una única cadena.
- 10
- 15 Un scFv contiene en general un dominio VH y un dominio VL conectados mediante un péptido enlazador. El acoplador secretable está compuesto de un péptido señal (para permitir la secreción) de las células, seguido por dos o más scFv conectados mediante péptidos enlazadores (Lx, Ly, Lz). Los enlazadores pueden ser de una longitud y una secuencia suficiente como para asegurar que cada primer y segundo dominios puedan, de manera independiente entre ellos, conservar sus diferentes especificidades de unión. Los scFv biespecíficos se pueden disponer en diferentes formatos:  $V_{H\alpha}$ -Lx- $V_{L\alpha}$ -Ly- $V_{H\beta}$ -Lz- $V_{L\beta}$ ,  $V_{L\alpha}$ -Lx- $V_{H\alpha}$ -Ly- $V_{H\beta}$ -Lz- $V_{L\beta}$ ,  $V_{L\alpha}$ -Lx- $V_{H\alpha}$ -Ly- $V_{L\beta}$ -Lz- $V_{H\beta}$ ,  $V_{H\alpha}$ -Lx- $V_{L\alpha}$ -Ly- $V_{L\beta}$ -Lz- $V_{H\beta}$ ,  $V_{H\alpha}$ -Lx- $V_{L\beta}$ -Ly- $V_{H\beta}$ -Lz- $V_{L\alpha}$ ,  $V_{H\beta}$ -Lx- $V_{L\alpha}$ -Ly- $V_{H\alpha}$ -Lz- $V_{L\beta}$ ,  $V_{L\alpha}$ -Lx- $V_{H\beta}$ -Ly- $V_{L\beta}$ -Lz- $V_{H\alpha}$ ,  $V_{L\beta}$ -Lx- $V_{H\alpha}$ -Ly- $V_{L\alpha}$ -Lz- $V_{H\beta}$ .
- 20
- 25 En realizaciones específicas, la "construcción de anticuerpo de cadena simple biespecífico" que se va a emplear en la composición de la divulgación comprende un Fv de cadena simple (scFv) biespecífico. Los ejemplos ilustrativos de moléculas de cadena simple biespecíficas se conocen en la materia y se describen en el documento WO 99/54440; Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970; Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025; Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197; Loffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103; y Bruhl, J. Immunol., (2001), 166, 2420-2426.
- 30
- 35 En aspectos específicos descritos en el presente documento, un formato molecular ejemplar de la divulgación proporciona una construcción de polipéptidos en la que la región que deriva del anticuerpo comprende una región  $V_H$  y una región  $V_L$ . En aspectos particulares, la orientación intramolecular del dominio  $V_H$  y el dominio  $V_L$ , que están unidos entre sí mediante un dominio enlazador, en el formato scFv no es decisivo para las construcciones de cadena simple biespecíficas. Los scFv con ambas disposiciones posibles (dominio  $V_H$  - dominio enlazador - dominio  $V_L$ ; dominio  $V_L$  - dominio enlazador - dominio  $V_H$ ) se contemplan en aspectos particulares en la construcción de cadena simple biespecífica.
- 40
- 45 En realizaciones específicas, la construcción del acoplador también puede comprender dominios adicionales, por ejemplo, el dominio de unión a antígeno puede contener múltiples dominios de unión de reconocimiento de antígeno que permiten el direccionamiento hacia múltiples antígenos; el dominio de activación puede contener múltiples dominios para activar células.
- 50 La expresión "cadena simple" tal como se usa de acuerdo con la presente divulgación en algunas realizaciones se refiere a que el primer y el segundo dominio de la construcción de cadena simple biespecífica están unidos covalentemente, preferentemente en la forma de una secuencia de aminoácidos colineal codificable por una única molécula de ácido nucleico.
- 50 La expresión "que se une a/que interactúa con" tal como se usa en el ámbito de la presente divulgación define una

unión/interacción de a menos dos "sitios de interacción de antígenos" entre sí. La expresión "sitio de interacción de antígeno", de acuerdo con la presente divulgación, un motivo de un polipéptido que presenta la capacidad de la interacción específica con un antígeno específico o un grupo específico de antígenos. La unión/interacción también se entiende que define un "reconocimiento específico". La expresión "que reconoce de forma específica" significa de acuerdo con la presente divulgación que la molécula de anticuerpo es capaz de interactuar de manera específica con y/o unirse a al menos dos aminoácidos de cada una de las moléculas diana tal como se define en el presente documento. La expresión se refiere a la especificidad de la molécula de anticuerpo, es decir, a su capacidad para discriminar entre las regiones específicas de la molécula diana humana tal como se define en el presente documento. La interacción específica del sitio de interacción de antígeno con su antígeno específico puede dar como resultado en un comienzo de una señal, por ejemplo, debido a la inducción de un cambio en la conformación del antígeno, una oligomerización del antígeno, etc. Además, la unión se puede ejemplificar mediante la especificidad de un "principio de llave y cerradura". Por lo tanto, los motivos específicos en la secuencia de aminoácidos del sitio de interacción de antígeno y el antígeno se unen entre sí como resultado de su estructura primaria, secundaria o terciaria así como el resultado de modificaciones secundarias de dicha estructura, en algunas realizaciones. La interacción específica del sitio de interacción de antígeno con su antígeno específico también puede dar como resultado una unión simple del sitio al antígeno.

La expresión "interacción específica" tal como se usa de acuerdo con la presente divulgación significa que la construcción de cadena simple biespecífica no reacciona de forma cruzada o esencialmente no reacciona de forma cruzada con (poli)péptidos de estructuras similares. La reactividad cruzada de un panel de construcciones de cadena sencilla biespecíficas en investigación se pueden ensayar, por ejemplo, evaluando la unión del panel de construcción de cadena sencilla biespecífica en condiciones convencionales (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 y Using *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999) para el (poli)péptido de interés así como para una serie de más o menos (estructuralmente y/o funcionalmente) (poli)péptidos estrechamente relacionados. Solo aquellos anticuerpos que se unen al (poli)péptido/proteína de interés pero no se unen o esencialmente no se unen a ninguno de los otros (poli)péptidos se consideran específicos para el (poli)péptido/proteína de interés. Los ejemplos para la interacción específica de un sitio de interacción de antígeno con un antígeno específico comprenden la especificidad de un ligando por su receptor. La definición particularmente comprende la interacción de los ligandos que induce una señal tras la unión de su receptor específico. Los ejemplos para los correspondientes ligandos comprenden citocinas que interaccionan/se unen con/a sus receptores específicos de citocina. Otro ejemplo para dicha interacción, que también está comprendida en particular por dicha definición, es la interacción de un determinante antigénico (epítipo) con el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo.

La expresión "que se une a/que interactúa con" también se puede referir a un epítipo conformacional, a un epítipo estructural o a un epítipo discontinuo que consiste en dos regiones de las moléculas diana humana o partes de las mismas. En el ámbito de la presente divulgación, se define un epítipo conformacional mediante dos o más secuencias discretas de aminoácidos separadas en la secuencia primaria que vienen juntas en la superficie de la molécula cuando el polipéptido se pliega en la proteína natural (Sela, (1969) *Science* 166, 1365 y Layer, (1990) *Cell* 61, 553-6).

En realizaciones particulares, las construcciones de la presente divulgación también se prevén para unirse de forma específica a/interaccionar con un(os) epítipo(s) conformacional(es)/estructural(es) compuesto(s) de y/o que comprende(n) las dos regiones del complejo CD3 humano descrito en el presente documento o partes del mismo tal como se desvela a continuación en el presente documento.

Por consiguiente, la especificidad se puede determinar de manera experimental mediante métodos conocidos en la materia y métodos tal como se desvelan y se describen en el presente documento. Tales métodos comprenden, pero no se limitan a análisis por transferencia de Western, ensayos de ELISA, RIA, ECL, IRMA, EIA y escaneados de péptidos.

La expresión "fragmento de anticuerpo o derivado del mismo" se refiere a anticuerpos de cadena simple o fragmentos de los mismos, anticuerpos sintéticos, fragmentos de anticuerpos, tales como Ig de camélido, Ig NAR, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos F(ab')<sub>3</sub>, Fv, anticuerpo Fv de cadena simple ("scFv"), bis-scFv, (scFv)<sub>2</sub>, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, proteína Fv estabilizada con disulfuro ("dsFv") y anticuerpo de un solo dominio (sdAb, nanocuerpo), etc., o un derivado de cualquiera de estos modificado químicamente. Los anticuerpos a usar de acuerdo con la divulgación o su(s) correspondiente(s) cadena(s) de inmunoglobulina se pueden modificar adicionalmente usando técnicas convencionales conocidas en la materia, por ejemplo, usando delección(es), inserción(es), sustitución(es), adición(es) y/o recombinación(es) de aminoácidos y/o cualquier otra(s) modificación(es) (por ejemplo, modificaciones postraduccionales y químicas, tales glicosilación y fosforilación) conocidas en la materia bien solas o en combinación. Los métodos para introducir tales modificaciones en la secuencia de ADN que subyace a la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina son bien conocidos por el experto en la materia; véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989).

La expresión "fragmento del anticuerpo o derivado del mismo" se refiere en particular a construcciones de (poli)péptidos que comprenden al menos una CDR.

Los fragmentos o derivados de las mencionadas moléculas de anticuerpos definen (poli) péptidos que son partes de las moléculas de anticuerpo anteriores y/o que se modifican mediante métodos químicos/bioquímicos o de biología molecular. Los correspondientes métodos se conocen en la materia y se describen, entre otros, en manuales de laboratorio (véase Sambrook *et al.*; Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición, 1989 y 3ª edición, 2001; Gerhardt *et al.*; Methods for General and Molecular Bacteriology; ASM Press, 1994; Lefkowitz; Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques; Academic Press, 1997; Golemis; Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002).

Los dominios variables comprendidos en las construcciones de cadena simple biespecíficas descritas en el presente documento pueden estar conectados mediante secuencias de enlazadores adicionales. La expresión "enlazador peptídico" define de acuerdo con la presente divulgación una secuencia de aminoácidos mediante la cual las secuencias de aminoácidos del primer dominio y del segundo dominio de la construcción definida se enlazan entre sí. Una característica técnica esencial de tal enlazador peptídico es que dicho enlazador peptídico no comprende ninguna actividad de polimerización. Las características de un enlazador peptídico, que comprende la ausencia de la promoción de estructuras secundarias, se conocen en la materia y se describen, por ejemplo, en Dall'Acqua *et al.* (Biochem. (1998) 37, 9266-9273), Cheadle *et al.* (Mol Immunol (1992) 29, 21-30) y Raag and Whitlow (FASEB (1995) 9(1), 73-80). Un enlazador peptídico previsto de menos de 5 aminoácidos puede comprender 4, 3, 2 o un aminoácido. Un "único" aminoácido particularmente preferido en el ámbito del "enlazador peptídico" es Gly. Por consiguiente, el enlazador peptídico puede consistir en uno o más restos de Gly. Además, se prefieren los enlazadores peptídicos que tampoco promueven ninguna estructura secundaria. La unión de los dominios entre sí se puede proporcionar mediante, por ejemplo, ingeniería genética. Los métodos para preparar construcciones de cadena simple biespecíficas fusionadas y unidas de manera operativa y expresarlas en células de mamífero o en bacterias son bien conocidos en la materia (por ejemplo, el documento WO 99/54440, Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates y Wiley-Interscience, N.Y. 1989 y 1994 o Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001).

Las construcciones de anticuerpo de cadena simple biespecífico descritas anteriormente en el presente documento y a continuación pueden ser construcciones de anticuerpos humanizados o desimmunizados. Los métodos para la humanización y/o la desimmunización de (poli) péptidos y, en particular, las construcciones de anticuerpos se conocen por el experto en la materia.

En un aspecto de la composición farmacéutica de la presente divulgación, las regiones  $V_H$  y  $V_L$  de un dominio específico CD3 humano derivan de un anticuerpo específico CD3 seleccionado del grupo que consiste en X35-3, VIT3, BMA030 (BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YTH12.5, F111-409, CLB-T3.4,2, TR-66, WT32, SPv-T3b, 11D8, XIII-141, XIII-46, XIII-87, 12F6, T3/RW2-8C8, T3/RW2-4B6, OKT3D, M-T301, SMC2, WT31 y F101.01. Estos anticuerpos específicos de CD3 son bien conocidos en la materia y, entre otras, se describen en Tunnacliffe (1989), Int. Immunol. 1, 546-550. En realizaciones específicas, las regiones de  $V_H$  y  $V_L$  derivan de anticuerpos/derivados de anticuerpos y similares que son capaces de reconocer específicamente la cadena CD3-8 humana o la cadena CD3- $\zeta$  humana.

## II. POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAN ACOPLADORES

La presente divulgación también abarca una composición que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una construcción de anticuerpo de cadena simple biespecífico tal como se define anteriormente y células que llevan 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 APN (ácido peptidonucleico) y puede ser un híbrido de los mismos.

Para el experto en la materia es evidente que se pueden añadir una o más secuencias reguladoras a la molécula de ácido nucleico comprendida en la composición de la divulgación. Por ejemplo, se pueden emplear promotores, potenciadores de la transcripción y/o secuencias que permiten la expresión inducida del polinucleótido de la divulgación. Un sistema inducible adecuado es, por ejemplo, la expresión génica regulada por tetraciclina tal como se describe, por ejemplo, por Gossen y Bujard (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 5547-5551) y Gossen *et al.* (Trends Biotech. 12 (1994), 58-62), o un sistema de expresión génica inducible con dexametasona, tal como se describe, por ejemplo, por Crook (1989) EMBO J. 8, 513-519.

Además, está previsto para otros fines adicionales que las moléculas de ácido nucleico puedan contener, por ejemplo, uniones tioéster y/o análogos de nucleótidos. Las modificaciones pueden ser útiles para la estabilización de la molécula de ácido nucleico contra las endonucleasas y/o exonucleasas en la célula. Las moléculas de ácido nucleico se pueden transcribir mediante un vector apropiado que comprende un gen quimérico que permite la transcripción de dicha molécula de ácido nucleico en la célula. A este respecto, también se entiende que dichos polinucleótidos se puedan usar para estrategias de "direccionamiento génico" o "terapia génica". En otra realización, las moléculas de ácido nucleico están marcadas. Los métodos para la detección de ácidos nucleicos son bien conocidos en la materia, por ejemplo, análisis por transferencia de Southern y Northern, PCR o extensión del cebador. Esta realización puede ser útil para métodos de detección sistemática para verificación de la introducción exitosa de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente durante las estrategias de terapia génica.

La(s) molécula(s) de ácido nucleico puede(n) ser una molécula de ácido nucleico quimérica producida de manera recombinante que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente bien solas o en combinación. En aspectos específicos, la molécula de ácido nucleico es parte de un vector.

- 5 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 dependerá de la función deseada e incluyen plásmidos, cósmidos, virus, bacteriófagos y otros vectores usados de manera convencional en ingeniería genética. Los métodos que son bien conocidos por los expertos en la materia se pueden usar para construir diversos plásmidos y vectores; véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook y col., (1989) y Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates y Wiley-Interscience, N.Y. (1989), (1994). Como alternativa, los polinucleótidos y los vectores de la divulgación se pueden reconstituir en liposomas para la administración a células diana. Se puede usar un vector de clonación para aislar las secuencias individuales de ADN. Se pueden transferir las secuencias relevantes en vectores de expresión cuando se requiera la expresión de un polipéptido en 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 de manera operativa a la secuencia de ácido nucleico que codifica construcciones de anticuerpos de cadena simple biespecíficos definidas en el presente documento. Tales secuencias reguladoras (elementos de control) son conocidos por el experto en la materia e incluyen un promotor, un casete de corte y empalme, un codón de iniciación de la traducción, un sitio de inserción para la introducción de una inserción en el vector. En realizaciones específicas, la molécula de ácido nucleico está unida de manera operativa a dichas secuencias de control de la expresión que permiten la expresión en células eucariotas o procariotas.

Se contempla que un vector es un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica construcciones de anticuerpo de cadena simple biespecífico definidas en el presente documento. En aspectos específicos, el vector es un vector vírico, tal como un vector de lentivirus. Los vectores de lentivirus están comercialmente disponibles, incluyendo los 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 a las que están ligadas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere en función del organismo hospedador. En procariotas, las secuencias de control generalmente incluyen promotores, sitios de unión a ribosomas y terminadores. En eucariotas, generalmente las secuencias de control incluyen promotores, terminadores y, en algunos casos, potenciadores, transactivadores o factores de transcripción. La expresión "secuencia de control" pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia sea necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes ventajosos adicionales.

La expresión "unida de manera operativa" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar en la forma que se pretende. Una secuencia de control "unida de manera operativa" a una secuencia codificante está ligada de tal manera que se logra la expresión de la secuencia codificante en condiciones compatibles con las secuencias de control. En el caso de que la secuencia de control sea un promotor, es obvio para un experto en la materia que preferentemente se usa ácido nucleico de cadena doble.

Por lo tanto, el vector mencionado es un vector de expresión, en determinadas realizaciones. Un "vector de expresión" es una construcción que se puede usar para transformar un hospedador seleccionado y proporciona la expresión de una secuencia codificante en el hospedador seleccionado. Los vectores de expresión pueden, por ejemplo, ser vectores de clonación, vectores binarios o vectores de integración. La expresión comprende la transcripción de la molécula de ácido nucleico preferentemente en un ARNm traducible. Los elementos reguladores que aseguran la expresión en procariotas y/o en células eucariotas son bien conocidos por los expertos en la materia. En el caso de las células eucariotas, comprenden normalmente promotores que aseguran la iniciación de la transcripción y opcionalmente, señales de poli-A que aseguran la terminación de la transcripción y la estabilización del transcrito. Los posibles elementos reguladores que permiten la expresión en células hospedadoras procariotas comprenden, por ejemplo, el promotor P<sub>L</sub>, lac, trp o tac en *E. coli*, y son ejemplos de elementos reguladores que permiten la expresión en células hospedadoras eucariotas el promotor AOX1 o GAL1 en levaduras o el promotor de CMV, de SV40, de RSV (virus de sarcoma de Rous), el potenciador de CMV, el potenciador de SV40 o un intrón de globina en mamíferos y otras células animales.

Además de los elementos que son responsables de la iniciación de la transcripción, tales elementos reguladores también pueden comprender señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio poli-A del SV40 o el sitio tk-poli-A, aguas abajo del polinucleótido. Además, en función del sistema de expresión usado, a la secuencia codificante de ácido nucleico mencionada se le pueden añadir secuencias líder capaces de dirigir el polipéptido hacia un compartimento celular o de secretarlo al medio, y son bien conocidas en la materia. La(s) secuencia(s) líder se ensambla(n) en la fase apropiada con las secuencias de traducción, iniciación y terminación, y preferentemente,

una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida, o una parte de la misma, al espacio periplásmico o al medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación en N-terminal que le atribuye características deseadas, por ejemplo, la estabilización o la purificación simplificada del producto recombinante expresado; véase las citas anteriores. En este contexto, en la materia se conocen 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 de promotores eucarióticos en vectores capaces de transformar células hospedadoras eucariotas transfectadas, pero también se pueden usar secuencias de control para hospedadores procariontes. Una vez se ha incorporado el vector en el hospedador apropiado, el hospedador se mantiene en condiciones adecuadas para un alto nivel de expresión de las secuencias de nucleótidos y, según se desee, la recolección y purificación del polipéptido de la divulgación puede seguir.

Los elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores transcripcionales así como traduccionales. Ventajosamente, los vectores de la divulgación descritos anteriormente comprenden un marcador seleccionable y/o puntuable. Los genes de marcadores seleccionables útiles para la selección de células transformadas son bien conocidos para los expertos en la materia y comprenden, por ejemplo, la resistencia a los antimetabolitos como la base de la selección para 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 hyg, que confiere resistencia a la higromicina (Marsh, Gene 32 (1984), 481-485). Se han descrito genes seleccionables adicionales, principalmente 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 Blastocidina S (Tamura, Biosci. Biotechnol. Biochem. 59 (1995), 2336-2338).

Los marcadores puntuables útiles también son conocidos por los expertos en la materia y están comercialmente disponibles. Ventajosamente, dicho marcador es un gen que codifica la luciferasa (Giacomin, Pl. Sci. 116 (1996), 59-72; Scikantha, J. Bact. 178 (1996), 121), la proteína verde fluorescente (Gerdes, FEBS Lett. 389 (1996), 44-47) o  $\beta$ -glucuronidasa (Jefferson, EMBO J. 6 (1987), 3901-3907). Esta realización es particularmente útil para la detección sistemática simple y rápida de células, tejidos y organismos que contienen un mencionado vector.

Tal como se ha descrito anteriormente, la molécula de ácido nucleico mencionada se puede usar en una célula, sola o como parte de un vector para expresar el polipéptido codificado en las células. Las moléculas de ácido nucleico o los vectores que contienen la(s) secuencia(s) de ADN que codifica una cualquiera de las construcciones de anticuerpo de cadena simple biespecífico se introducen en las células que a su vez producen el péptido de interés. Las moléculas de ácido nucleico y los vectores mencionados se pueden diseñar para la introducción directa o para la introducción mediante liposomas, o vectores víricos (por ejemplo, de adenovirus, de retrovirus) en una célula. En determinadas realizaciones, las células son linfocitos T, linfocitos T CAR, células NK, células NKT, MSC, células madre neuronales o células madre hematopoyéticas, por ejemplo.

De acuerdo con lo anterior, la presente divulgación se refiere a métodos para vectores derivados, en particular, plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos usados de manera convencional en ingeniería genética que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de polipéptidos de construcciones de anticuerpo de cadena simple biespecífico definidas en el presente documento. Preferentemente, dicho vector es un vector de expresión y/o un vector de transferencia génica o de direccionamiento. Los vectores de expresión que proceden de virus tales como retrovirus, virus vaccinia, virus adenoasociados, virus herpes o virus del papiloma bovino, se pueden usar para administrar los polinucleótidos o el vector mencionado en poblaciones de células diana. Se pueden usar 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. (citado anteriormente), Ausubel (1989, citado anteriormente.) u otros libros de texto convencionales. Como alternativa, las moléculas de ácido nucleico y los vectores mencionados se pueden reconstituir en liposomas para la administración a células diana. Los vectores que contienen las moléculas de ácido nucleico de la divulgación se pueden transferir a la célula hospedadora mediante métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de hospedador celular. Por ejemplo, normalmente se usa transfección con cloruro de calcio para células procariontes, mientras que se puede usar tratamiento con fosfato de calcio o electroporación para otros hospedadores celulares; véase Sambrook, anteriormente citado.

### III. GENERALIDADES DE VECTORES

Las moléculas de acoplador de la presente divulgación se pueden expresar a partir de un vector de expresión. Las técnicas recombinantes para generar tales vectores de expresión son bien conocidas en la materia.

El término "vector" se usa para referirse a una molécula portadora de ácido nucleico en la que se puede insertar una

secuencia de ácido nucleico para la introducción en una célula en la que se puede replicar. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "exógena", lo que significa que es extraña para la célula en la que el vector se está introduciendo o que la secuencia es homóloga para una secuencia en la célula pero en una posición en el ácido nucleico de la célula hospedadora en la que normalmente no se encuentra la secuencia. Los vectores incluyen plásmidos, 5 cósmidos, virus (bacteriófagos, virus animales y virus de plantas) 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).

La expresión "vector de expresión" se refiere a cualquier tipo de construcción genética que comprende un ácido nucleico que codifica un ARN capaz de transcribirse. En algunos casos, las moléculas de ARN se traducen después a proteína, polipéptido o 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 variedad de "secuencias de control", que se refieren a las secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia codificante unida de manera operativa en una célula hospedadora. Además de las 15 secuencias de control que rigen la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que también cumplen otras funciones y se describen a continuación.

#### A. Promotores y potenciadores

20 Un "promotor" es una secuencia de control que es una región de una secuencia de ácido nucleico en la que se controlan la iniciación y la tasa de transcripción. Puede contener elementos genéticos a los que se pueden unir las 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 frases "colocado de manera operativa", "unido de manera operativa", "bajo control", y "bajo control transcripcional" significa que un promotor está en una ubicación y/u 25 orientación funcional correctas en relación con una secuencia de ácido nucleico para controlar la iniciación transcripcional y/o la expresión de esa secuencia.

Un promotor generalmente comprende una secuencia que sirve para colocar el sitio de inicio para la síntesis de ARN. El ejemplo mejor conocido de esto es la caja TATA, pero en algunos promotores que carecen de una caja 30 TATA, tales como, por ejemplo, el promotor para el gen de la desoxinucleotidil transferasa terminal de mamíferos y el promotor de los genes tardíos de SV40, un elemento discreto que subyace al propio sitio de inicio ayuda a fijar el lugar de iniciación. Los elementos adicionales del promotor regulan la frecuencia del comienzo de la transcripción. Típicamente, se localizan en la región 30 110 pb aguas arriba del sitio de inicio, aunque también se ha demostrado que una serie de promotores contienen elementos funcionales aguas abajo del sitio de inicio. Para tener una 35 secuencia codificante "bajo el control de" un promotor, se coloca el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del marco de lectura transcripcional "aguas abajo" de (es decir, a 3' de) el promotor elegido. El promotor "aguas arriba" estimula la transcripción del ADN y promueve la expresión del ARN codificado.

El espaciado entre los elementos promotores con frecuencia es flexible, de manera que la función del promotor se 40 mantiene cuando los elementos se invierten o se mueven uno con respecto al otro. En el promotor tk, el espaciado entre los elementos promotores se puede aumentar hasta 50 pb antes de que la actividad comience a disminuir. En función del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar bien de manera cooperativa o de forma independiente para activar la transcripción. Se puede usar o no un promotor en conjunto con un "potenciador", que se refiere a una secuencia reguladora que actúa en cis en la activación transcripcional de una secuencia de 45 ácido nucleico.

Un promotor puede ser uno asociado de forma natural con una secuencia de ácido nucleico, tal como se puede obtener aislando las 5 secuencias principales no codificantes localizadas aguas arriba del segmento codificante y/o exón. Tal promotor se puede denominar "endógeno". De manera similar, un potenciador puede ser uno asociado de 50 forma natural con una secuencia de ácido nucleico, localizada o bien aguas abajo o aguas arriba de esa secuencia. Como alternativa, se obtendrán determinadas ventajas colocando el segmento de ácido nucleico codificante bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo, que se refiere a un promotor que no se asocia normalmente con una secuencia de ácido nucleico en su ambiente natural. Un potenciador recombinante o heterólogo se refiere también a un potenciador que normalmente no se asocia con una secuencia de ácido nucleico en su ambiente 55 natural. Tales 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 sean "de origen natural", es decir, que contengan diferentes elementos de diferentes regiones reguladoras de la transcripción, y/o mutaciones que alteran la expresión. Por ejemplo, los promotores que se usan más comúnmente en la construcción de ADN recombinante incluyen los sistemas de promotores de la  $\beta$  lactamasa (penicilinas), lactosa y triptófano (trp). Además de producir secuencias de ácido nucleico de promotores y potenciadores de forma 60 sintética, se pueden producir secuencias usando la tecnología recombinante de clonación y/o amplificación de ácido nucleico, incluyendo la PCR™, en conexión con las composiciones desveladas en el presente documento (véase las Patentes de Estados Unidos N.º 4.683.202 y 5.928.906). Además, se contempla que también se pueden usar las secuencias de control que dirigen la transcripción y/o la expresión de secuencias en orgánulos no nucleares tales 65 como las mitocondrias y los cloroplastos y similares.

Naturalmente, será importante emplear un promotor y/o un potenciador que dirija de forma eficaz la expresión del segmento de ADN en el orgánulo, en el tipo de célula, en el tejido, en el órgano o en el organismo elegido para la expresión. Los expertos en la materia de biología molecular generalmente conocen el uso de combinaciones de promotores, potenciadores y tipos celulares para la expresión de proteínas, (véase, por ejemplo Sambrook *et al.* 1989). Los promotores empleados pueden ser constitutivos, específicos de tejidos, inducibles y/o útiles en condiciones apropiadas para dirigir la expresión en alto nivel del segmento de ADN introducido, de manera que es ventajoso en la producción a gran escala de proteínas y/o de péptidos recombinantes. El promotor puede ser heterólogo o endógeno.

Adicionalmente, cualquier combinación de promotor/potenciador también se podría usar para dirigir la expresión. Otra realización posible es el uso de un sistema de expresión citoplásmica T3, T7 o SP6. Las células eucariotas pueden soportar la transcripción citoplásmica de ciertos promotores bacterianos si se proporciona la apropiada polimerasa bacteriana, bien como parte del complejo de administración o como una construcción de expresión génica adicional.

La identidad de los elementos o promotores específicos de tejidos, así como los ensayos para caracterizar su actividad, son bien conocidos por los expertos en la materia.

En realizaciones particulares, se modula la expresión de una molécula de polipéptido acoplador secretable. La expresión se puede modular en una variedad de formas, aunque en realizaciones específicas, una o más secuencias reguladoras dirigen la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido acoplador de una forma espacial y/o temporal. En algunos casos, se modula la expresión para aumentar la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido acoplador, de manera que haya un correspondiente aumento en el nivel de polipéptido acoplador en la célula inmunológica o se secreta a partir de la misma. En algunos casos se modula la expresión para reducir la expresión de un polinucleótido que codifica una molécula de acoplador, de manera que haya una correspondiente reducción en el nivel de polipéptido acoplador en la célula inmunológica o se secreta a partir de la misma. Las situaciones en las que se desea reducir la expresión incluyen aquellas en las que el acoplador no se desea o ya no se desea, por ejemplo, en tejido normal. La modulación de la expresión se puede comparar con el nivel de expresión en ausencia de la secuencia reguladora particular o del(los) factor(es) que la regula(n).

En determinadas realizaciones, la expresión de un polipéptido acoplador se modula tras la exposición de una correspondiente secuencia reguladora a uno o más factores. En realizaciones específicas, la expresión se modula tras la exposición a factores asociados al tumor. Los ejemplos ilustrativos de factores asociados al tumor incluyen factores presentes en tejido hipóxico. En algunas realizaciones, los factores son citocinas y/o quimiocinas. Por ejemplo, la hipoxia induce la expresión de HIF-1 $\alpha$ , un factor de transcripción que podría inducir la expresión del acoplador que está bajo el control de un elemento de respuesta a hipoxia (ERH). La hipoxia también podría estabilizar las moléculas de acoplador que contienen un dominio de degradación dependiente de oxígeno (DDDO). Otro ejemplo de una sustancia, que se produce mediante células tumorales y podría regular la expresión génica del acoplador, es el ácido láctico. También se puede requerir una señal de iniciación específica para la traducción eficaz de secuencias codificantes. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG o secuencias adyacentes. Puede ser necesario proporcionar señales exógenas de control de la traducción, incluyendo el codón de iniciación ATG. Un experto en la materia sería capaz de determinar fácilmente esto y de proporcionar las señales necesarias.

En determinadas realizaciones, el uso de sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) se usa para crear mensajes multigénicos o policistronicos, y estos pueden usarse en las realizaciones.

En determinadas realizaciones las secuencias 2A se usan para crear mensajes multigénicos y estos se pueden usar en las realizaciones.

Los vectores pueden incluir sitios de clonación múltiple (SCM), que es una región de ácido nucleico que contiene múltiples sitios de enzimas de restricción, cualquiera de los cuales se puede usar junto con la tecnología recombinante convencional para digerir el vector. "Digestión de enzimas de restricción" se refiere a la escisión catalítica de la molécula de ácido nucleico con una enzima que funciona solo en localizaciones específicas en una molécula de ácido nucleico. Muchas de estas enzimas de restricción están comercialmente disponibles. El uso de estas enzimas se entiende ampliamente por estos expertos en la materia. Frecuentemente, un vector se lineariza o se fragmenta usando una enzima de restricción que corta en el SCM para permitir que las secuencias exógenas se unan al vector. "Unión" se refiere al proceso de formar enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico, que pueden o no ser contiguos entre sí. Las técnicas que implican las enzimas de restricción y las reacciones de unión son bien conocidas por los expertos en la técnica de la tecnología recombinante.

Los sitios de corte y empalme, las señales de terminación, los orígenes de replicación y los marcadores seleccionables también se pueden emplear.

## **B. Vectores de plásmidos**

En determinados aspectos, se contempla un vector de plásmido para su uso para transformar una célula

- hospedadora. En general, los vectores de plásmido que contienen replicón y secuencias de control que provienen de especies compatibles con la célula hospedadora se usan en conexión con estos hospedadores. El vector normalmente lleva un sitio de replicación, así como secuencias de marcaje que son capaces de proporcionar la selección del fenotipo en células transformadas. En un ejemplo no limitante, *E. coli* se transforma a menudo usando derivados de pBR322, un plásmido que proviene de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes de 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 ser modificado para que contenga, por ejemplo, promotores que se pueden usar por el organismo microbiano para la expresión de sus propias proteínas.
- Además, los vectores de fagos que contienen replicón y secuencias de control que son compatibles con el microorganismo hospedador se pueden usar como vectores transformantes en conexión con estos hospedadores. Por ejemplo, el fago lambda GEMTM 11 se puede utilizar en la preparación de un vector de fago recombinante que se puede usar para transformar células hospedadoras, tales como, por ejemplo, *E. coli* LE392.
- Los vectores de plásmidos útiles adicionales incluyen vectores pIN (Inouye *et al.*, 1985); y vectores pGEX, para uso en la generación de proteínas de fusión solubles de glutatión S transferasa (GST) para la posterior purificación y separación o escisión. Otras proteínas de fusión adecuadas son aquellas con  $\beta$  galactosidasa, ubiquitina y similares.
- Las células hospedadoras bacterianas, por ejemplo, *E. coli*, que comprenden el vector de expresión, se cultivan en cualquiera de una serie de medios adecuados, por ejemplo, LB. La expresión de la proteína recombinante en determinados vectores se puede inducir, tal como se entenderá por aquellos 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 más alta. Tras cultivar las bacterias durante un período adicional, generalmente de entre 2 y 24 h, las células se recolectan mediante centrifugación y se lavan para eliminar el medio residual.

### C. Vectores víricos

- La capacidad de determinados virus para infectar células o penetrar en células mediante endocitosis mediada por receptor e integrarse en el genoma de la célula hospedadora y expresar genes víricos de forma estable y eficaz los hace candidatos atractivos para la transferencia de ácidos nucleicos extraños en células (por ejemplo, células de mamífero). Los componentes de la presente divulgación pueden ser un vector vírico que codifica uno o más CAR de la divulgación. Los ejemplos no limitantes de vectores víricos que se pueden usar para administrar un ácido nucleico de la presente divulgación se describen a continuación.

#### i. Vectores de adenovirus

- Un método particular para la administración del ácido nucleico implica el uso de un vector de expresión de adenovirus. Aunque se sabe que los vectores de adenovirus tienen baja capacidad de integración en el ADN genómico, esta característica se compensa con la alta eficacia de la transferencia génica ofrecida por estos vectores. "Vector de expresión de adenovirus" pretende incluir aquellas construcciones que contienen suficientes secuencias de adenovirus para (a) mantener el empaquetamiento de la construcción y (b) para expresar en última instancia una construcción específica de tejido o de célula que se ha clonado en la misma. El conocimiento de la organización genética del adenovirus, un virus de ADN de cadena doble, lineal, de 36 kb, permite la sustitución de grandes partes de ADN de adenovirus por secuencias extrañas de hasta 7 kb (Grunhaus y Horwitz, 1992).

#### ii. Vectores de AAV

- El ácido nucleico se puede introducir en la célula usando la transfección asistida por adenovirus. Se han documentado elevadas eficacias de transfección en sistemas celulares que usan sistemas acoplados a adenovirus (Kelleher y Vos, 1994; Cotten *et al.*, 1992; Curiel, 1994). El virus adenoasociado (AAV) es un sistema de vector atractivo para su uso en las células de la presente divulgación, dado que tiene una alta frecuencia de integración y puede infectar células indivisibles, haciéndolo, por lo tanto, útil para la administración de genes en células de mamífero, por ejemplo, en cultivo tisular (Muzyczka, 1992) o *in vivo*. El AAV tiene un amplio rango de infectividad de hospedadores (Tratschin *et al.*, 1984; Laughlin *et al.*, 1986; Lebkowski *et al.*, 1988; McLaughlin *et al.*, 1988). Los detalles en referencia a la generación y al uso de vectores rAAV se describen en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.139.941 y 4.797.368.

#### iii. Vectores de retrovirus

- Los retrovirus son útiles como vectores de administración debido a su capacidad para integrar sus genes en el genoma del hospedador, para transferir una gran cantidad de material genético extraño, para infectar un amplio espectro de especies y de tipos celulares y para empaquetarlos en líneas celulares especiales (Miller, 1992).
- Un vector de retrovirus ejemplar comprende en una dirección de 5' a 3' un scFv(4H5) específico de EphA2 unido a un scFv específico de CD3 seguido por mOrange (mO) separado por un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES)

**(FIG. 4).**

Con el fin de construir un vector de retrovirus, se inserta un ácido nucleico (por ejemplo, uno que codifica la secuencia deseada) en el genoma vírico en el lugar de determinadas secuencias víricas para producir un virus con replicación defectuosa. Con el fin de producir viriones, se construye una línea celular de empaquetamiento que contiene los genes gag, pol y env pero sin LTR y los componentes de empaquetamiento (Mann *et al.*, 1983). Cuando un plásmido recombinante que contiene un ADNc, junto con LTR de retrovirus y secuencias de empaquetamiento se introduce en una línea celular especial (por ejemplo, mediante precipitación de 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 en el medio de cultivo (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann *et al.*, 1983). El medio que contiene los retrovirus recombinantes después se recolecta, opcionalmente se concentra, y se usa para la transferencia génica. Los vectores de retrovirus son capaces de infectar una amplia variedad de tipos celulares. Sin embargo, la integración y la expresión estable requieren la división de células hospedadoras (Paskind *et al.*, 1975).

Los lentivirus son virus complejos, que, además de los genes de retrovirus comunes gag, pol y env, contienen otros genes con funciones reguladoras o estructurales. Los vectores de lentivirus son bien conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Naldini *et al.*, 1996; Zufferey *et al.*, 1997; Blomer *et al.*, 1997; las Patentes de 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 en simios: SIV. Los vectores de lentivirus se han generado al multiplicar la atenuación de los genes de virulencia del VIH, por ejemplo, los genes env, vif, vpr, vpu y nef se delecionan haciendo al vector biológicamente seguro.

Los vectores de lentivirus recombinantes son capaces de infectar células indivisibles y se pueden usar tanto para la transferencia génica *in vivo* como *ex vivo* y la expresión de secuencias de ácido nucleico. Por ejemplo, los lentivirus recombinantes capaces de infectar una célula indivisible en donde una célula hospedadora adecuada se transfecta con dos o más vectores que llevan las funciones de empaquetamiento, principalmente gag, pol y env, así como rev y tat se describen en la Patente de Estados Unidos N.º 5.994.136. Se puede direccionar el virus recombinante mediante la unión de la proteína de la envoltura recombinante con un anticuerpo o un ligando particular para el direccionamiento hacia un receptor de un tipo celular en 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 sobre una célula diana específica, por ejemplo, el vector es ahora específico de diana.

En aspectos particulares descritos en el presente documento, el retrovirus comprende una proteína de la envoltura (env) que determina el intervalo de células hospedadoras que en última instancia se pueden infectar y transformar mediante retrovirus recombinantes generados a partir de las líneas celulares. Los ejemplos ilustrativos de genes env que derivan de retrovirus que se pueden emplear en la invención incluyen, aunque sin limitación: VSV-G, envolturas de MLV, envoltura 10A1, BAEV, FeLV-B, RD114, SSAV, ébola, Sendai, FPV (virus de la gripe aviar), gp41 y gp120, y las envolturas del virus de la gripe.

En un aspecto descrito en el presente documento, la divulgación proporciona retrovirus pseudotipados con la glucoproteína VSV-G.

**2. Otros vectores víricos**

Se pueden emplear otros vectores víricos como construcciones de vacuna en la presente divulgación. Se pueden emplear vectores que derivan de virus tales como el virus vaccinia (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988), el virus sindbis, el citomegalovirus y el virus herpes simple. Ofrecen varias características atractivas para diversas células de mamífero (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988; Horwich *et al.*, 1990).

**D. Administración usando virus modificados**

Un ácido nucleico que se va a administrar se puede alojar en un virus infeccioso que se ha diseñado genéticamente para que exprese un ligando de unión específica. La partícula del virus, por lo tanto, se unirá específicamente a los receptores relacionados de la célula diana y administrará los contenidos a la célula. Se desarrolló una nueva estrategia diseñada para permitir el direccionamiento específico de vectores de retrovirus basándose en la modificación química de un retrovirus mediante la adición química de restos de lactosa a la envoltura vírica. Esta modificación puede permitir la infección específica de los hepatocitos mediante receptores de sialoglicoproteína.

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

**E. Administración del vector y transformación celular**

Los métodos adecuados para la administración de ácido nucleico o la transformación de células son conocidos para un experto en la materia. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, la administración directa de ADN tal como mediante la transfección *ex vivo*, mediante inyección, etcétera. Mediante la aplicación de técnicas conocidas en la materia, las células se pueden transformar de manera estable o transitoria.

**F. Transformación *ex vivo***

Los métodos de transfección de células eucariotas y de tejidos extraídos de un organismo en un entorno *ex vivo* son conocidos por los expertos en la materia. Por lo tanto, se contempla que los linfocitos T o los tejidos se pueden extraer y transfectar *ex vivo* usando ácidos nucleicos de la presente divulgación. En aspectos particulares, las células o tejidos trasplantados se pueden colocar en un organismo. En facetas preferidas, un ácido nucleico se expresa en las células trasplantadas.

**IV. CÉLULAS HOSPEDADORAS QUE COMPRENDEN ACOPLADORES**

Adicionalmente se contempla que la composición farmacéutica de la divulgación comprende una célula hospedadora transformada o transfectada con un vector definido anteriormente en el presente documento. La célula hospedadora se puede producir introduciendo al menos uno de los vectores descritos anteriormente o al menos una de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente en la célula hospedadora. La presencia del al menos un vector o al menos una molécula de ácido nucleico en el hospedador puede mediar la expresión de un gen que codifica las construcciones de anticuerpo de cadena simple biespecífico descritas anteriormente.

La molécula de ácido nucleico o el vector descrito que se introduce en la célula hospedadora puede o bien integrarse en el genoma del hospedador o bien se puede conservar de forma extracromosómica.

La célula hospedadora puede ser cualquier célula procarionota o eucariota, pero en realizaciones específicas es una célula eucariota. En realizaciones específicas, la célula hospedadora es una bacteria, una célula de insecto, de hongo, de planta o de animal. En particular, se contempla que el mencionado hospedador puede ser una célula de mamífero, más preferentemente una célula humana o una línea celular humana. Las células hospedadoras particularmente preferidas comprenden células inmunológicas, células CHO, células COS, líneas celulares de mieloma como SP2/0 o NS/0.

La composición farmacéutica de la divulgación también puede comprender un compuesto proteínico capaz de proporcionar una señal de activación para las células inmunológicas efectoras útil para la proliferación celular o la estimulación celular. En aspectos particulares, el compuesto proteínico no se entiende como un dominio adicional de la construcción de anticuerpo de cadena simple biespecífico definido anteriormente, sino al menos como un componente adicional de la composición farmacéutica de la divulgación.

A la luz de la presente divulgación, los "compuestos proteínicos" que proporcionan una señal de activación para las células inmunológicas efectoras pueden ser, por ejemplo, una señal de activación adicional para linfocitos T (por ejemplo, una molécula coestimuladora adicional: moléculas de la familia B7, OX40 L, 4-1BBL), o una citocina adicional: interleucina (por ejemplo, IL-2, IL-7 o IL-15) o un compuesto de acoplamiento a NKG-2D. Los formatos preferidos de compuestos proteínicos comprenden anticuerpos biespecíficos adicionales y fragmentos o derivados de los mismos, por ejemplo, scFv biespecíficos. Los compuestos proteínicos pueden comprender, pero sin limitación, fragmentos scFv específicos para el receptor de linfocitos T o superantígenos. Los superantígenos se unen directamente a determinadas subfamilias de las regiones variables del receptor de linfocitos T en una forma independiente del MHC, mediando de este modo la señal de activación de los linfocitos T primarios. El compuesto proteínico también puede proporcionar una señal de activación para la célula inmunológica efectora que no es un linfocito T. Los ejemplos de células inmunológicas efectoras que no son linfocitos T comprenden, entre otras, células NK o células NKT.

Un aspecto descrito en el presente documento se refiere a un proceso para la producción de una composición de la divulgación, comprendiendo el proceso cultivar una célula hospedadora definida anteriormente en el presente documento en condiciones que permitan la expresión de la construcción y la recuperación de la construcción de anticuerpo de cadena simple biespecífico producida del cultivo. Sin embargo, en aspectos particulares, se proporciona al individuo la célula o una pluralidad de células.

Las condiciones para el cultivo de células que llevan una construcción de expresión que permite la expresión de las moléculas de acoplador son conocidas en la materia, ya que son procedimientos para purificación/recuperación de las construcciones cuando se desee.

En un aspecto, la célula hospedadora es un linfocito T que comprende un receptor de TCR diseñado genéticamente o un CAR. Los receptores de linfocito T de origen natural comprenden dos subunidades, una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ , cada una de las cuales es una proteína única producida mediante un fenómeno de recombinación en el

- genoma de cada linfocito T. Se pueden explorar las bibliotecas de TCR para determinar su selectividad a antígenos diana particulares. Un "TCR diseñado genéticamente" se refiere a un TCR natural, que tiene una elevada avidéz y reactividad hacia los antígenos diana que se selecciona, se clona y/o posteriormente se introduce en una población de linfocitos T usada para la inmunoterapia adoptiva. Al contrario que los TCR diseñados genéticamente, los CAR se diseñan genéticamente para unirse a antígenos diana de una forma independiente de MHC. En aspectos particulares, un CAR comprende un dominio de unión extracelular que incluye, pero sin limitación, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo; un dominio transmembrana; uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelular y un dominio de señalización primaria.
- En diversos aspectos descritos en el presente documento, un linfocito T comprende uno o más polinucleótidos que codifican moléculas de acoplador que reconocen el mismo antígeno diana como un CAR o un TCR diseñado genéticamente expresado por el linfocito T. En realizaciones particulares, un CAR o un linfocito T que expresa TCR diseñado genéticamente comprende uno o más polinucleótidos que codifican moléculas de acoplador que reconocen un antígeno diana que es diferente del antígeno diana reconocido por un CAR o un TCR diseñado genéticamente, pero que se expresa en la misma célula diana.

## V. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

- De acuerdo con la presente divulgación, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a una composición para la administración a un individuo. En un aspecto preferido, la composición farmacéutica comprende una composición para administración parenteral, transdérmica, intraluminal, intraarterial, intratecal o intravenosa o para inyección directa en un cáncer. En particular, se contempla que dicha composición farmacéutica se administra al individuo mediante infusión o inyección. La administración de las composiciones adecuadas se pueden efectuar de diferentes maneras, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, tópica o intradérmica.

- La composición farmacéutica de la presente divulgación puede comprender adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la materia e 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 tales vehículos se pueden formular mediante métodos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto en una dosis adecuada.

- El régimen de dosificación lo determinará el médico tratante y los factores clínicos. Como se sabe en la técnica médica, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área superficial corporal, la edad, el compuesto particular que se va a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, el estado general de salud y otros fármacos que se estén administrando concurrentemente. Una dosificación preferida para la administración puede 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, incluso más preferentemente de 0,24 µg a 1,2 mg y lo más preferentemente de 0,24 µg a 240 mg de unidades por kilogramo de peso corporal por día. Las dosificaciones particularmente preferidas se mencionan a continuación en el presente documento. El progreso se puede controlar mediante evaluación periódica. Las dosificaciones variarán, pero una dosificación preferida para administración intravenosa de ADN es de aproximadamente  $10^6$  a  $10^{12}$  copias de la molécula de ADN.

- Las composiciones de la divulgación se pueden administrar de manera local o de manera sistémica. La administración generalmente será parenteral, por ejemplo, intravenosa; También se puede administrar ADN directamente al sitio diana, por ejemplo, mediante administración biolística a un sitio diana interno o externo o mediante catéter a un sitio en una arteria. En un aspecto preferido, la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea, y en una realización incluso más preferida, por vía intravenosa. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones o emulsiones. 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 transportadores 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, aceites de Ringer lactados o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de fluidos y nutrientes, reabastecedores 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 proteínicos, como, por ejemplo, albúmina sérica o inmunoglobina, preferentemente de origen humano. Se contempla que la composición farmacéutica de la divulgación pueda comprender, además de las construcciones proteínicas de anticuerpo de cadena simple biespecífico o las moléculas de ácido nucleico o vectores que codifican la misma (tal como se describe en la presente divulgación), agentes biológicamente activos adicionales, dependiendo del uso previsto de la composición farmacéutica.

- Cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento se pueden incluir en un kit. En un ejemplo no limitante, un kit puede estar comprendido por una o más células para su uso en terapia celular y/o los reactivos para

generar una o más células para su uso en terapia celular que lleva vectores de expresión recombinantes. Los componentes del kit se proporcionan en medios contenedores adecuados.

5 Algunos componentes de los kits se pueden envasar en medios acuosos o en forma liofilizada. El medio contenedor de los kits generalmente incluirá al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa u otro medio contenedor, en el que se puede colocar un componente, y preferentemente, adecuadamente alicuotado. Cuando haya más de un componente en el kit, el kit también contendrá generalmente un segundo, tercero u otro recipiente adicional en el que se puedan colocar de forma separada los componentes adicionales. Sin embargo, diversas combinaciones de componentes pueden estar comprendidas en un vial. Los kits también incluirán típicamente un medio para contener 10 los componentes en un confinamiento cerrado para su venta comercial. Tales recipientes pueden incluir la inyección o contenedores de plástico moldeados por soplado en los que se mantienen los viales deseados.

15 Cuando los componentes del kit se proporcionan en una y/o más soluciones líquidas, la solución líquida es una solución acuosa, siendo una solución acuosa estéril particularmente útil. En algunos casos, los medios del recipiente en sí pueden ser una jeringa, una pipeta y/u otro aparato similar, desde el cual se puede aplicar la formulación a un área infectada del cuerpo, inyectar a un animal y/o incluso aplicar a y/o mezclar con los otros componentes del kit.

20 Sin embargo, los componentes del kit se pueden proporcionar como polvo(s) seco(s). Cuando los reactivos y/o los componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo se puede reconstituir mediante la adición de un disolvente adecuado. Se pretende que el disolvente también se pueda proporcionar en otros medios del recipiente. Los kits también pueden comprender un segundo medio del recipiente para contener un tampón estéril farmacéuticamente aceptable y/u otro diluyente.

25 En aspectos particulares descritos en el presente documento, las células que se van a usar en terapia celular se proporcionan en un kit t, 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 aspectos específicos, los reactivos y los materiales incluyen cebadores para amplificar las secuencias deseadas, nucleótidos, tampones adecuados o reactivos del tampón, sales, etcétera, y en algunos casos, los reactivos incluyen vectores y/o ADN que codifican una molécula de acoplador tal como se describe en el presente documento y/o elementos reguladores para los mismos. 30

En aspectos particulares descritos en el presente documento, 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 escalpelo, etcétera.

35 En algunos casos, el kit, además de aspectos de terapia celular, también incluye una segunda terapia de cáncer, tal como quimioterapia, terapia hormonal y/o inmunoterapia, por ejemplo. El(los) kit(s) se pueden adaptar a un cáncer particular para un individuo y comprender las respectivas segundas terapias de cáncer para el individuo.

## **VI. USOS TERAPÉUTICOS DE ACOPLADORES Y LINFOCITOS T QUE COMPRENEN ACOPLADORES**

40 En diversos aspectos, las construcciones de anticuerpo de cadena simple biespecifico, las secuencias de ácido nucleico, los vectores, las células hospedadoras, tal como se contemplan en el presente documento y/o las composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos se usan para la prevención, el tratamiento o la mejora de una enfermedad cancerosa, tal como una enfermedad tumoral. En aspectos particulares descritos en el presente documento, la composición farmacéutica de la presente divulgación puede ser particularmente útil en la prevención, 45 la mejora y/o el tratamiento de cáncer, incluyendo cáncer que tiene tumores sólidos, por ejemplo.

50 Tal como se usa en el presente documento, "tratamiento" o "tratar", incluye cualquier efecto beneficioso o deseable en los síntomas o en la patología de una enfermedad o afección patológica, y puede incluir incluso reducciones mínimas en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o afección que se está tratando, por ejemplo, cáncer. Opcionalmente, el tratamiento puede implicar o bien la reducción o la mejora de síntomas de la enfermedad o afección, o el retraso de la progresión de la enfermedad o afección. "Tratamiento" no indica necesariamente la completa erradicación o la cura de la enfermedad o afección, o de los síntomas asociados a la misma.

55 Tal como se usa en el presente documento, "prevenir", y palabras similares tales "prevenido", "prevención", etc., indican una estrategia de prevención, inhibición o reducción de la probabilidad de ocurrencia o recurrencia de una enfermedad o afección, por ejemplo, cáncer. También se refiere a un retraso en la aparición o recurrencia de una enfermedad o afección o retraso de la ocurrencia o recurrencia de los síntomas de una enfermedad o afección. Tal como se usa en el presente documento, "prevención" y palabras similares también incluye reducir la intensidad, el efecto, los síntomas y/o la carga de una enfermedad o afección antes de la aparición o recurrencia de la enfermedad o afección. 60

65 En aspectos particulares descritos en el presente documento, la presente divulgación contempla, en parte, células, construcciones de anticuerpo de cadena simple biespecifico, moléculas de ácido nucleico y vectores que se pueden administrar o bien solos o en cualquier combinación usando vectores convencionales y/o sistemas de administración génica y, en al menos algunos aspectos, junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En determinados aspectos, posterior a la administración, dichas moléculas de ácido nucleico o vectores se pueden

integrar de forma estable en el genoma del sujeto.

En aspectos específicos, se pueden usar vectores víricos que son específicos para determinadas células o tejidos y persisten en dichas células. Los vehículos farmacéuticos y excipientes adecuados son bien conocidos en la materia.  
5 Las composiciones preparadas de acuerdo con la divulgación se pueden usar para la prevención o el tratamiento o retraso de las enfermedades identificadas anteriormente.

Además, la divulgación se refiere a un método para la prevención, el tratamiento o la mejora de una enfermedad tumoral que comprende la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de células que llevan una molécula de acoplador, una secuencia de ácido nucleico, un vector, tal como se contempla en el presente documento y/o producidas mediante un proceso tal como se contempla en el presente documento.  
10

Las posibles indicaciones para la administración de la(s) composición(es) de células de acoplamiento EphA2 ejemplares son enfermedades cancerosas, incluyendo enfermedades tumorales, que incluyen cánceres de mama, de próstata, de pulmón y de colon o cánceres epiteliales/carcinomas tales como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cánceres del tracto urogenital, por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer del endometrio, 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, cánceres del conducto biliar, cáncer de esófago, cáncer de las glándulas salivares y cáncer de la glándula tiroides. En aspectos particulares, el cáncer es positivo para EphA2, por ejemplo. Las indicaciones ejemplares para la administración de la(s) composición(es) de las células de acoplador CD19 son células cancerosas, incluyendo cualquier neoplasia que exprese CD19. Éstas incluyen en general todas las neoplasias sanguíneas que provienen del linaje de los linfocitos B. Además, incluye neoplasias que expresan de forma anómala CD19. La administración de la(s) composición(es) de la divulgación es útil para todas las etapas y tipos de cáncer, incluyendo enfermedades mínimas residuales, cáncer temprano, cáncer avanzado y/o cáncer metastásico y/o cáncer refractario, por ejemplo.  
15  
20  
25

La divulgación abarca adicionalmente protocolos de coadministración con otros compuestos, por ejemplo, construcciones de anticuerpo biespecífico, toxinas dirigidas u otros compuestos, que actúan a través de células inmunológicas. El régimen clínico para la coadministración del(los) compuesto(s) de la invención puede abarcar la coadministración a la vez, antes o después de la administración del otro componente. Las terapias de combinación particulares incluyen la quimioterapia, radiación, cirugía, terapia hormonal u otros tipos de inmunoterapia.  
30

Los aspectos descritos en el presente documento se refieren a un kit que comprende una construcción de anticuerpo de cadena simple biespecífico tal como se define anteriormente, una secuencia de ácido nucleico tal como se define anteriormente, un vector tal como se define anteriormente y/o un hospedador tal como se define anteriormente. También se contempla que el kit de la presente divulgación comprenda una composición farmacéutica tal como se describe anteriormente en el presente documento, bien sola o en combinación con medicamentos adicionales para administrarlos a un individuo que necesite tratamiento o intervención médica.  
35

## 40 VII. TERAPIA DE COMBINACIÓN

En determinados aspectos, los métodos de la presente divulgación para aspectos clínicos se combinan con otros agentes eficaces en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, tales como agentes anticancerosos. Un agente "anticanceroso" es capaz de afectar de forma negativa al cáncer en un sujeto, por ejemplo, eliminando 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 tumoral, inhibiendo el crecimiento tumoral, reduciendo el riesgo sanguíneo a las células tumorales o cancerosas, promoviendo una respuesta inmunológica frente a células cancerosas o un tumor, previniendo o inhibiendo la progresión del cáncer, o aumentando la esperanza de vida de un sujeto con cáncer. Más generalmente, estas otras composiciones se proporcionarían en una cantidad combinada eficaz para eliminar o inhibir la proliferación de la célula. Este proceso puede implicar poner en contacto las células cancerosas con la construcción de expresión y el(los) agente(s) o factor(es) múltiple(s) en el mismo momento. Esto se puede lograr poniendo en contacto la célula con una 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(los) segundo(s) agente(s).  
45  
50  
55

La resistencia de la célula tumoral a agentes de quimioterapia y radioterapia, por ejemplo, representa un principal problema en oncología clínica. Una meta de la investigación actual del cáncer es encontrar modos de mejorar la eficacia de la quimioterapia y de la radioterapia combinándolas con otras terapias. En el contexto de la presente divulgación, se contempla que la terapia de linfocitos T se podrá usar de forma similar en conjunto con la intervención quimioterapéutica, radioterapéutica o inmunoterapéutica, así como agentes proapoptóticos o agentes reguladores del ciclo celular.  
60

Como alternativa, la presente terapia de invención puede preceder o seguir a otros agentes de tratamiento mediante intervalos que varían desde minutos hasta semanas. En aspectos en los que se aplique al individuo otro agente y la presente divulgación, en general, se aseguraría de que no pase un período de tiempo significativo entre el momento  
65

de administración, de manera que el agente y la terapia de la invención aún fuesen capaces de ejercer un efecto ventajoso combinado sobre la célula. En dichos casos, se contempla que se pondrá en contacto la célula con ambas modalidades en aproximadamente 12-24 horas entre sí y, más preferentemente, en aproximadamente 6-12 h entre sí. En algunas situaciones, puede ser deseable extender el período de tiempo para el tratamiento de forma significativa, sin embargo, cuando pasan desde varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las respectivas administraciones.

Se pueden emplear diversas combinaciones, la presente divulgación es "A" y el agente secundario, tal como radioterapia o quimioterapia, por ejemplo, es "B":

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

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 tanto como sea necesario. También se contempla que se puedan aplicar diversas terapias convencionales, así como la intervención quirúrgica en combinación con la terapia celular de la invención.

#### A. Quimioterapia

Las terapias de cáncer también incluyen una variedad de terapias de combinación tanto con compuestos químicos como con tratamientos basados en radiación y/o terapias dirigidas no inmunológicas. Las quimioterapias de combinación incluyen todas las clases de agentes quimioterapéuticos, incluyendo los agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides vegetales, antibióticos, agentes hormonales y fármacos anticancerígenos misceláneos. Los agentes específicos incluyen, por ejemplo, abraxano, altretamina, docetaxel, herceptin, metotrexato, novantrona, zoladex, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfán, nitrosurea, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, plicamicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión al receptor de estrógenos, taxol, gemcitabina, fuldarabina, navelbina, inhibidores de la proteína farnesil transferasa, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina y vinblastina o cualquier variante análoga o derivada de las anteriores y también combinaciones de las mismas.

En realizaciones específicas, se emplea la quimioterapia para el individuo junto con la divulgación, por ejemplo antes, durante y/o después de la administración de las realizaciones.

#### B. Radioterapia

Otros factores que provocan daño en el ADN y que se han usado ampliamente incluyen lo que comúnmente se conoce como rayos  $\gamma$ , rayos X y/o la administración dirigida de radioisótopos a células tumorales. También se contemplan otras formas de factores de daño de ADN tales como microondas y radiación UV. Lo más probable es que todos estos factores provoquen un amplio intervalo de daño en el ADN, en los precursores de ADN, en la replicación y en la reparación de ADN y en el ensamblaje y mantenimiento de los cromosomas. Los intervalos de dosificación para los rayos X varían de dosis diarias de 50 a 200 roentgens para períodos prolongados de tiempo (3 a 4 semanas), a dosis únicas de 2000 a 6000 roentgens. Los intervalos de dosificación para radioisótopos varían ampliamente y dependen de la semivida del isótopo, de la fuerza y del tipo de radiación emitida, y de la absorción por las células neoplásicas.

Los términos "en contacto" y "expuesto", cuando se aplican a una célula, se usan en el presente documento para describir el proceso mediante el cual una construcción terapéutica y un agente quimioterapéutico o radioterapéutico se administran a una célula diana o se colocan en yuxtaposición directa con la célula diana. Para lograr la muerte celular o la estasis de las células, se administran ambos agentes a una célula en una cantidad combinada eficaz para eliminar a la célula o evitar que se divida.

#### C. Terapias dirigidas no basadas en inmunología

Las terapias de cáncer también incluyen una variedad de terapias de combinación con terapias dirigidas no basadas en inmunología. Estas incluyen por ejemplo agentes que inhiben las vías de señalización, tales como WNT, p53 y/o vías de señalización de RB. Otros ejemplos incluyen agentes que inhiben las tirosina cinasas, BRAF, STAT3, c-met, regulan la expresión génica, inducen muerte celular o bloquean la formación de vasos sanguíneos. Los ejemplos de agentes específicos incluyen imatinib mesilato, dasatinib, nilotinib, bosutinib, lapatinib, gefinitib, erlotinib, tensirolimus, everolimus, vemurafenib, crizotinib, vorinostat, romidepsin, bexaroteno, alitronina, tretionina, bortezomib, carfilzomib, pralatrexato, sorafenib, sunitinib, pazopanib, regorafenib o cabozantinib.

#### D. Inmunoterapia

Los agentes de inmunoterapia generalmente se basan en el uso de células inmunológicas efectoras y moléculas para el direccionamiento y la destrucción de células cancerosas. El efector inmunológico puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador en la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo solo puede servir como un efector de terapia o puede reclutar otras células para efectuar realmente la destrucción de linfocitos T. El anticuerpo también se puede conjugar con un fármaco o toxina (agente quimioterapéutico, radionucleido, cadena A de ricina, toxina del cólera, toxina pertussis, etc.) y sirve meramente como un agente de direccionamiento. Como alternativa, el efector puede ser un linfocito que lleva una molécula de superficie que interactúa, tanto directa como indirectamente, con una diana de célula tumoral. Diversas células efectoras incluyen linfocitos T citotóxicos y células NK.

La inmunoterapia que no sea la terapia de la invención descrita en el presente documento se podría usar por lo tanto como una terapia combinada, en conjunto con la presente terapia de linfocitos T. La estrategia general para la terapia combinada se trata a continuación. En general, la célula tumoral debe llevar algún marcador que sea susceptible de direccionamiento, es decir, que no esté presente en la mayoría de las otras células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de estos puede ser adecuado para el direccionamiento en el ámbito de la presente divulgación. Los marcadores tumorales comunes incluyen el agente carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, el antígeno asociado al tumor urinario, el antígeno fetal, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, antígeno Sialyl Lewis, MucA, MucB, PLAP, el receptor de estrógenos, el receptor de laminina, erb B y p155 y similares.

#### E. Genes

En otra realización más, el tratamiento secundario es una terapia génica en la que un polinucleótido terapéutico se administra antes, después o al mismo tiempo que las realizaciones clínicas de la presente divulgación. La divulgación abarca una variedad de productos de expresión, que incluyen inductores de proliferación celular, inhibidores de la proliferación celular, o reguladores de la muerte celular programada.

#### F. Cirugía

Aproximadamente el 60 % de las personas con cáncer se someterán a cirugía de algún tipo, que incluye cirugía preventiva, de diagnóstico o estadificación, curativa y paliativa. La cirugía curativa es un tratamiento de cáncer que se puede usar en conjunto con otras terapias, tales como el tratamiento de la presente divulgación, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia génica, inmunoterapia y/o terapias alternativas.

La cirugía curativa incluye la resección, en la que todo o parte del tejido canceroso físicamente se extrae, se extirpa y/o se destruye. La resección tumoral se refiere a la eliminación física de al menos parte de un tumor. Además de la resección tumoral, el tratamiento mediante cirugía incluye la cirugía láser, la criocirugía, la electrocirugía y la cirugía controlada microscópicamente (cirugía de Mohs). Adicionalmente se contempla que la presente divulgación se pueda usar en conjunto con la eliminación de cánceres superficiales, precánceres o cantidades incidentales de tejido normal.

Tras la excisión de parte de todas las células cancerosas, tejidos o tumores, se puede formar una cavidad en el cuerpo. El tratamiento se puede lograr mediante perfusión, inyección directa o aplicación local del área con una terapia anticáncer adicional. Tal tratamiento se puede repetir, 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 también pueden ser de dosis variables.

#### G. Otros agentes

Se contempla que se puedan usar otros agentes en combinación con la presente divulgación para mejorar la eficacia terapéutica del tratamiento. Estos agentes adicionales incluyen los agentes inmunomoduladores, agentes que afectan a la regulación positiva de los receptores de superficie y a las uniones GAP, agentes citostáticos y de diferenciación, inhibidores de adhesión celular o agentes que aumentan la sensibilidad de las células hiperproliferativas a los inductores de apoptosis. Los agentes inmunomoduladores incluyen el factor de necrosis tumoral; interferón alfa, beta y gamma; IL-2 y otras citocinas; F42K y otros análogos de citocina; o MIP-1, MIP-1beta, MCP-1, RANTES y otras quimiocinas. Adicionalmente se contempla que la regulación positiva de los receptores de superficie celular o sus ligandos tales como el ligando Fas / Fas, DR4 o DR5 / TRAIL las capacidades de inducción apoptótica de la presente divulgación mediante el establecimiento de un efecto autocrino o paracrino en las células hiperproliferativas. Los aumentos de la señalización intercelular mediante el aumento del número de uniones GAP aumentarían los efectos antihiperproliferativos en la población de células hiperproliferativas adyacente. En otras realizaciones, se pueden usar agentes citostáticos o de diferenciación en combinación con la presente divulgación para mejorar la eficacia antihiperproliferativa de los tratamientos. Se contemplan inhibidores de adhesión celular para mejorar la eficacia de la presente divulgación. Los ejemplos de inhibidores de adhesión celular son inhibidores de cinasas de adhesión focal (FAK) y lovastatina. Se contempla adicionalmente que otros agentes que aumentan la

sensibilidad de una célula hiperproliferativa para la apoptosis, tal como el anticuerpo c225, se pudieran usar en combinación con la presente divulgación para mejorar la eficacia del tratamiento.

### Ejemplos

5 Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar de forma más completa las realizaciones preferidas de la divulgación. No deben interpretarse de ningún modo, sin embargo, como limitantes del amplio alcance de la divulgación.

### 10 VIII. EJEMPLO 1: GENERACIÓN DE CÉLULAS DE ACOPLAMIENTO

Los inventores han desarrollado una nueva clase de células (por ejemplo, pero sin limitación, linfocitos T, células NK o células NKT) modificándolas genéticamente con moléculas secretables, denominadas acopladores. Los acopladores comprenden un dominio de reconocimiento de antígeno y un dominio de activación. Los dominios de reconocimiento de antígeno y de activación se pueden unir a moléculas simples o múltiples y comprenden, por ejemplo, 1) scFv, 2) péptidos y/o 3) ligandos naturales. El dominio de reconocimiento de antígeno se une a moléculas que están presentes en y/o sobre células diana o secretadas por células diana. El dominio de activación reconoce moléculas expresadas sobre la superficie celular de células o moléculas que se secretan por células. Los ejemplos de dominios de activación incluyen dominios que se unen a CD3, CD16, CD28, CD40, CD134 o CD137. El modo de acción ejemplar de células de acoplamiento se resume en las FIG. 1 y 3.

En el presente documento se proporcionan linfocitos T ejemplares que secretan acopladores que comprenden, a modo de ejemplo, un dominio de reconocimiento de antígeno específico para EphA2, CD19, CD123, LeY, B7H3, HER2 o EGFR y un dominio de activación específico para CD3 o CD16 que usa vectores de retrovirus (acoplador de linfocitos T EphA2 (FIG. 6), acoplador de linfocitos T CD19 (FIG. 7), acoplador de linfocitos T CD123 (FIG. 8), acoplador de linfocitos T LeY (FIG. 9), acoplador de linfocitos T B7H3 (FIG. 10), acoplador de linfocitos T HER2 (FIG. 11), o acoplador de linfocitos T EGFR (FIG. 12), y acoplador de células NK EphA2 (FIG. 13).

### 30 IX. EJEMPLO 2: LOS LINFOCITOS T DE ACOPLAMIENTO RECONOCEN CÉLULAS DIANA DE UNA FORMA DEPENDIENTE DE ANTÍGENO

En aspectos particulares, los inventores proporcionan una estrategia alternativa para producir linfocitos T específicos para antígenos que utiliza la expresión de un acoplador de linfocitos T biespecífico secretable en linfocitos T que comprenden dos scFv. Un scFv es específico para CD3 y el otro scFv es específico para un antígeno de elección. Los inventores construyeron 1) un acoplador de linfocitos T biespecífico que reconoce CD3 y el antígeno tumoral EphA2; 2) un acoplador de linfocitos T biespecífico que reconoce CD3 y el antígeno tumoral CD19; y 3) un acoplador de linfocitos T biespecífico que reconoce CD3 y el antígeno tumoral CD123, 4) un acoplador de linfocitos T biespecífico que reconoce CD3 y el antígeno tumoral LeY, 5) un acoplador de linfocitos T biespecífico que reconoce CD3 y el antígeno tumoral B7H3, 6) un acoplador de linfocitos T biespecífico que reconoce CD3 y el antígeno tumoral HER2, y 7) un acoplador de linfocitos T biespecífico que reconoce CD3 y el antígeno tumoral EGFR. Los linfocitos T de acoplamiento se generaron mediante transducción vírica de linfocitos T como un método ejemplar. Dado que las moléculas de acoplador no se pueden detectar fácilmente, se generó una molécula de acoplador específica de EphA2 con un marcador de 6xHis-myc (EphA2-HM ENG, donde ENG es *engager*, acoplador; FIG. 5A). Los linfocitos T que expresan el EphA2-ENG y EphA2-HM ENG eliminaron las células diana positivas en EphA2, lo que demuestra que EphA2-HM ENG es funcional (FIG. 5B). Usando anticuerpos de myc y anticuerpos de 6xHis, se demostró que las moléculas de EphA2-HM ENG se unen a la superficie celular de linfocitos T (FIG. 5C) y se secretan al medio (FIG. 5D). Parte de esta realización es que se puede añadir un 3<sup>er</sup> dominio a la molécula de acoplador para mejorar su función. Aquí se ha añadido un 'marcador de reconocimiento', demostrando que es factible modificar adicionalmente las moléculas de acoplador.

50 **Los linfocitos T EphA2-ENG reconocen células tumorales positivas en EphA2.** Los linfocitos T que expresan el acoplador de linfocitos T CD3/EphA2 (linfocitos T EphA2-ENG) reconocen las células cancerosas positivas en EphA2 (FIG. 6A). Los linfocitos T EphA2-ENG se cocultivaron con células tumorales positivas para EphA2 (U373, A549), y negativas para EphA2 (K562). Después de 24 horas, se recolectó el medio para su análisis. Los linfocitos T EphA2-ENG reconocieron U373 y A549 al contrario de K562, a juzgar por la producción de citocina proinflamatoria IFN $\gamma$ . Las células K562 modificadas genéticamente para expresar EphA2 indujeron la producción de IFN $\gamma$ , destacando que EphA2 se tiene que expresar por las células diana para inducir la producción de IFN $\gamma$ . Los linfocitos T no transducidos (NT) y los linfocitos T que secretan un acoplador que reconoce un antígeno no expresado en estas células tumorales (CD19) no producen IFN $\gamma$ . Los linfocitos T EphA2-ENG también proliferaron en presencia de células tumorales positivas para EphA2 al contrario de los linfocitos T NT y específicos de CD19. Se muestran los resultados de 4 donantes ejemplares (FIG. 6B).

65 **Los linfocitos T CD19-ENG eliminan las células tumorales positivas para CD19 (FIG. 7).** Los linfocitos T de acoplador de CD19 se generaron mediante transducción de retrovirus y aproximadamente el 50 % de los linfocitos T se transdujeron a juzgar por el análisis FACS (FIG. 7A,B). Los linfocitos T CD19-ENG reconocieron células positivas en CD19 a juzgar por el ensayo de liberación de cromo (FIG. 7C) y la secreción de IFN- $\gamma$  e IL-2 (FIG. 7D) en

contraste con las células K562 negativas en CD19. Ninguna de las dianas fue reconocida por los linfocitos T no transducidos o los linfocitos T que secretan acopladores específicos para un antígeno irrelevante (linfocitos T EphA2-ENG).

5 **Los linfocitos T CD123-ENG eliminan las células tumorales positivas para CD123 (FIG. 8).** Se generaron dos vectores de retrovirus que codifican moléculas de acoplador específicas de CD123 que derivan de los MAbs 26292 (292) y (32716 (716) específicos de CD123, que se unen a distintos epítomos en la molécula CD123 (FIG. 8A). Los linfocitos T específicos de CD123(292) y CD123(716) se generaron mediante transducción de retrovirus y se modificó genéticamente más del 80 % de los linfocitos T a juzgar por el análisis FACS (FIG. 8A). Los linfocitos T  
10 ENG específicos de CD123(292) y CD123(716) reconocieron las células diana positivas en CD123, los linfocitos T KG1a y Jurka que se modificaron genéticamente para expresar CD123 (Jurkat-CD123), en ensayos de cocultivo a juzgar por la secreción de IFN $\gamma$  (FIG. 8B,C). Por el contrario, los linfocitos T Jurka parentales negativos en CD123 no indujeron secreción de IFN $\gamma$ , y los linfocitos T ENG específicos para un antígeno irrelevante (CD19) no liberaron citocinas en respuesta a cualquiera de las células diana ensayadas (FIG. 8C). En un ensayo de citotoxicidad convencional, los linfocitos T ENG específicos de CD123(292) y CD123(716) eliminaron las células KG1a al contrario  
15 que los linfocitos T ENG específicos de CD19, confirmando la especificidad del antígeno (FIG. 8D).

**Los linfocitos T LeY-ENG eliminan las células tumorales positivas en LeY (FIG. 9).** Para demostrar que los linfocitos T Ley-ENG eliminan las células diana positivas en LeY, los presentes inventores realizaron ensayos de  
20 citotoxicidad convencionales con linfocitos T Ley-ENG y linfocitos T CD19-ENG como efectores y las células diana K562 (CD19-, LeY-) y KG1a (CD19-, LeY+). Solo las células diana positivas en LeY fueron eliminadas por los linfocitos T Ley-ENG. Por el contrario, los linfocitos T CD19-ENG no tuvieron actividad citolítica.

**Los linfocitos T B7H3-ENG reconocen y eliminan las células tumorales positivas en B7H3 (FIG. 10).** Para  
25 determinar si los linfocitos T B7H3-ENG reconocen de manera específica células tumorales positivas en B7H3, los presentes inventores realizaron un ensayo de cocultivo de linfocitos T B7H3-ENG con células tumorales positivas en B7H3 (U373, LM7, CHLA255) y células tumorales negativas en B7H3 (HTB119). Los linfocitos T CD19-ENG sirvieron como controles dado que todas las células tumorales ensayadas no expresaron CD19. Solo los linfocitos T  
30 diana positivos en B7H3 indujeron la producción de IFN $\gamma$  de linfocitos T B7H3-ENG (FIG. 10A) demostrando la activación específica de antígeno de los linfocitos T B7H3-ENG. Para determinar la actividad citolítica de los linfocitos T B7H3-ENG, se incubaron U373, LM7, CHLA255 con linfocitos T B7H3-ENG o linfocitos T CD19-ENG. Aunque los linfocitos T B7H3-ENG eliminaron todas las células tumorales a juzgar por la tinción con cristal violeta, no se observó eliminación en presencia de linfocitos T CD19-ENG (FIG. 10B).

**Los linfocitos T HER2-ENG reconocen células tumorales positivas en HER2 (FIG. 11).** Para demostrar que los  
35 linfocitos T HER2-ENG reconocen células diana positivas en HER2 de una forma dependiente de antígeno, los presentes inventores cocultivaron linfocitos T HER2-ENG o linfocitos T no transducidos (NT) con células tumorales positivas en HER2 (U373) y negativas en HER2 (MDA). Tras 24 horas, se determinó IFN $\gamma$ . Mientras que U373 indujo la producción de IFN $\gamma$ , MDA no lo hizo, lo que demuestra el reconocimiento específico de antígeno de células  
40 tumorales positivas en HER2. No se observó producción de IFN $\gamma$  con ninguna de las dianas en presencia de linfocitos T NT.

**Los linfocitos T 806-ENG reconocen células tumorales positivas en EGFR (FIG. 12).** Para demostrar que los  
45 linfocitos T 806-ENG reconocen el epítipo conformacional de EGFR 806 en células en las que EGFR tiene el gen amplificado o que expresan EGFRVIII, los presentes inventores realizaron ensayos de cocultivo con U373 (EGFR bajo positivo), A431 (con el gen amplificado de EGFR), K562 (EGFR negativo), y K562 modificado genéticamente para expresar EGFRVIII (K562-EGFRVIII). Se observó la producción significativa de IFN $\gamma$  en presencia de A431 y K562-EGFRVIII. Por el contrario, ninguna de las dianas (todas CD19 negativas) indujeron la producción de linfocitos  
50 T CD19-ENG.

**Los linfocitos T que secretan acopladores de células NK específicos de EphA2 activan las células NK de una forma específica de antígeno (FIG. 13).** Los linfocitos T se transdujeron con un vector de retrovirus que codifica un  
55 acoplador de célula NK que consiste en un scFv específico de CD16 unido a un scFv específico de EphA2 (FIG 13A). Los linfocitos T transducidos (linfocitos T CD16.EphA2-ENG) se incubaron en placas recubiertas de IL13R $\alpha$ 2 o EphA2 en ausencia o presencia de células NK autólogas. La producción de IFN $\gamma$  se midió tras 24 horas. Los cocultivos de linfocitos T CD16.EphA2-ENG/células NK produjeron altos niveles de IFN $\gamma$  en presencia de EphA2, pero no en presencia de IL13R $\alpha$ 2. Además, los linfocitos T CD16.EphA2-ENG o las células NK por sí mismos no produjeron IFN $\gamma$ , lo que indica que los linfocitos T CD16.EphA2-ENG son capaces de redirigir las células NK de  
60 forma específica hacia EphA2 (FIG 13B).

### X. EJEMPLO 3: LOS LINFOCITOS T DE ACOPLAMIENTO REDIRIGEN LOS LINFOCITOS T ESPECTADORES HACIA LAS CÉLULAS DIANA - ESTUDIOS *IN VITRO*

**Los sobrenadantes de linfocitos T EphA2-ENG 'arman' linfocitos T no transducidos para reconocer células tumorales (FIG. 14A).** Se recogió el medio de linfocitos T EphA2-ENG y se mezcló con linfocitos T no transducidos  
65 y células tumorales. Los linfocitos T no transducidos produjeron IFN $\gamma$  tras la exposición a U373, indicativo de la

activación de linfocitos T. Por el contrario, los linfocitos T no transducidos no produjeron IFN $\gamma$  cuando se mezclaron con el medio recolectado de los linfocitos T no transducidos. Por lo tanto, los linfocitos T EphA2-ENG secretan acopladores de linfocitos T para 'armar' linfocitos T espectadores. Se muestran los resultados de 4 donantes ejemplares.

5 **Los linfocitos T EphA2-ENG 'arman' linfocitos T no transducidos para reconocer células tumorales (FIG. 14B,C).** Los linfocitos T EphA2-ENG se colocaron en el transpocillo de un ensayo de cocultivo y las células tumorales y los linfocitos T no transducidos se colocaron en la parte inferior (pocillo de la placa). Las células tumorales viables se determinaron mediante tinción con cristal violeta. La eliminación de células tumorales dependiente de la presencia de linfocitos T no transducidos, demuestra que los linfocitos T EphA2-ENG secretan activamente acopladores. Los linfocitos T CD19-ENG no tuvieron efecto antitumoral, lo que destaca de nuevo la especificidad del enfoque. **Comparación directa de linfocitos T EphA2-ENG y linfocitos T EphA2-CAR (FIG. 14D).** La actividad se comparó con linfocitos T que expresan una 2<sup>a</sup> generación de CAR que contiene el mismo scFv específico de EphA2 que el acoplador (linfocitos T EphA2-CAR). Las células U373 se incubaron con  $1 \times 10^5$  linfocitos T que contienen porcentajes en aumento de linfocitos T EphA2-ENG o EphA2-CAR transducidos. Tras 48 horas, las células tumorales viables se midieron mediante ensayo MTS. Para lograr la eliminación de más del 99 % de las células tumorales, solo aproximadamente el 10 % de los linfocitos T tuvieron que expresar acopladores EphA2. Solo se observó la misma actividad antitumoral cuando aproximadamente el 75 % de linfocitos T expresó EphA2-CAR ( $p < 0,00001$ ).

20 **Los linfocitos T CD19-ENG 'arman' linfocitos T no transducidos para reconocer células tumorales (FIG. 15).** Los linfocitos T EphA2-ENG se colocaron en el transpocillo de un ensayo de cocultivo y las células tumorales BV173 que expresan luciferasa y los linfocitos T no transducidos se colocaron en la parte inferior (pocillo de la placa). Las células tumorales viables se determinaron mediante el ensayo de la luciferasa. La eliminación de células tumorales dependiente de la presencia de linfocitos T no transducidos, lo que demuestra que los linfocitos T CD19-ENG secretan activamente acopladores. Los linfocitos T EphA2-ENG no tuvieron efecto antitumoral, lo que destaca de nuevo la especificidad del enfoque.

30 **Los linfocitos T EphA2-ENG secretan más acopladores tras la activación (FIG. 16).** Los linfocitos T EphA2-ENG se activaron con proteína EphA2 o la proteína control (HER2). Los linfocitos T EphA2-ENG activados secretaron IFN $\gamma$  (FIG. 16A) y más moléculas de acoplador (FIG. 16B). La actividad antitumoral de los linfocitos T de acoplamiento activados y no activados se evaluó en un ensayo de cocultivo transpocillo con células U373 positivas en EphA2 que expresan luciferasa. Los linfocitos T EphA2-ENG con EphA2 activado fueron aproximadamente 10 veces más potentes que los linfocitos T EphA2-ENG de control, lo que demuestra que se secretan más acopladores tras la activación de linfocitos T (FIG. 16C). No se observó un aumento en la eliminación de linfocitos T EphA2-ENG activados frente a las células tumorales negativas en EphA2 (BV173) lo que confirma la especificidad (FIG. 16D).

#### 40 XI. EJEMPLO 4: LOS LINFOCITOS T DE ACOPLAMIENTO REDIRIGEN LOS LINFOCITOS T ESPECTADORES HACIA LAS CÉLULAS DIANA - ESTUDIOS *IN VIVO*

Los acopladores EphA2 inducen la expansión de linfocitos T transducidos y espectadores *in vivo* (FIG. 17). El modelo de xenoinjerto SCID de cáncer de pulmón humano A549 se usó para demostrar que los linfocitos T EphA2-ENG se expanden *in vivo*. Los ratones portadores de tumor (n=5) o de control (n=5) se inyectaron por vía intravenosa (i.v.) con una mezcla de  $5 \times 10^6$  linfocitos T EphA2-ENG que expresan eGFP.ffluc y  $5 \times 10^6$  linfocitos T no modificados, y recibieron una dosis intraperitoneal (i.p.) de IL2. Mientras que los linfocitos T EphA2-ENG se expandieron en ratones portadores del tumor, no se observó expansión en ausencia de tumores (FIG. 17A). Para demostrar que los linfocitos T EphA2-ENG inducen la expansión de linfocitos T espectadores *in vivo*, se inyectó a los ratones portadores de tumor por vía i.v. con una mezcla de  $5 \times 10^6$  linfocitos T EphA2-ENG y  $5 \times 10^6$  linfocitos T que expresan eGFP.ffLuc (n=5) o  $5 \times 10^6$  linfocitos T CD19-ENG y  $5 \times 10^6$  linfocitos T que expresan eGFP.ffLuc (n=5). Los linfocitos T que expresan eGFP.ffLuc solo se expandieron cuando se coinyectaron con linfocitos T EphA2-ENG a juzgar por las imágenes de bioluminiscencia (FIG. 17B). Estos resultados indican que los acopladores EphA2 indujeron la expansión de linfocitos T transducidos y espectadores de una forma dependiente de antígeno *in vivo*.

#### 55 XII. EJEMPLO 5: LOS LINFOCITOS T DE ACOPLAMIENTO TIENE UNA POTENTE ACTIVIDAD ANTITUMORAL *IN VIVO*

La actividad antitumoral *in vivo* de linfocitos T de acoplamiento se evaluó en 4 modelos de animales. El esquema experimental se resume en la FIG. 18.

60 **Los linfocitos T EphA2-ENG tienen una potente actividad antitumoral en el modelo de glioma (FIG. 19A,C).** Se evaluó la actividad antitumoral de linfocitos T EphA2-ENG en los modelos de glioma humano y de xenoinjerto SCID. Siete días después de la inyección intracraneal de  $1 \times 10^5$  células U373.eGFP.ffLuc, se inyectó a los ratones por vía estereotáctica en el sitio del tumor con  $2 \times 10^6$  linfocitos T EphA2-ENG (n=8) o linfocitos T CD19-ENG (n=5). Los animales no tratados sirvieron como controles (n=5). Se usaron imágenes de bioluminiscencia para seguir el crecimiento tumoral (FIG. 19A,B). Los ratones tratados con linfocitos T EphA2-ENG tuvieron una reducción de 2 log o mayor en su señal tumoral, dando como resultado una supervivencia a largo plazo sin tumor en 5 de 8 ratones

( $p < 0,0005$ ) (**FIG. 19C**).

**Los linfocitos T EphA2-ENG tienen una potente actividad antitumoral en el modelo de cáncer de pulmón sistémico (FIG. 19D,F).**

Se evaluó la eficacia antitumoral de linfocitos T EphA2-ENG en el modelo de cáncer de pulmón metastásico A549.eGFP.ffLuc. Se inyectaron  $2,5 \times 10^6$  células A549.eGFP.ffLuc por vía i.v. en el día 0, y en el día 7, 14, 21, los ratones recibieron  $1 \times 10^7$  linfocitos T EphA2-ENG ( $n=5$ ) o linfocitos T CD19-ENG ( $n=4$ ) por vía i.v. con una dosis i.p. de IL2. Los animales no tratados sirvieron como controles ( $n=5$ ). Solo los ratones tratados con linfocitos T EphA2-ENG tuvieron una reducción significativa ( $p < 0,005$ ) en su señal tumoral tan pronto como 5 días después de la 1ª dosis de linfocitos T (**Fig. 19D,E**), dando como resultado una ventaja en la supervivencia en comparación con ratones no tratados y ratones tratados con linfocitos T de acoplador de CD19 ( $p < 0,005$ ) (**Fig. 19F**).

**Los linfocitos T CD19-ENG tienen una potente actividad antitumoral en el modelo de leucemia (FIG. 20A,B).**

Se determinó la actividad antitumoral de linfocitos T CD19-ENG en el modelo de leucemia BV173.ffLuc NSG. Se inyectaron células BV173.ffLuc por vía i.v. en el día 0, y en el día 7, 14, 21, los ratones recibieron  $1 \times 10^7$  linfocitos T CD-19-ENG ( $n=5$ ) o linfocitos T EphA2-ENG ( $n=5$ ) por vía i.v. con una dosis i.p. de IL2. Los animales no tratados sirvieron como controles ( $n=5$ ). Solo los ratones tratados con linfocitos T CD19-ENG tuvieron una reducción significativa ( $p < 0,005$ ) en su señal tumoral. Todos los ratones tratados con linfocitos T CD19-ENG se curaron de su enfermedad al contrario que los ratones que recibieron linfocitos T EphA2-ENG.

**Los linfocitos T CD19-ENG tienen un potente modelo de linfoma antitumoral (FIG. 21A,B).**

Se inyectaron células Daudi.ffLuc por vía i.v. en el día 0, y en el día 3, 6, 9, los ratones recibieron  $1 \times 10^7$  linfocitos T CD-19-ENG ( $n=5$ ) o linfocitos T no transducidos (NT) ( $n=5$ ) por vía i.v. Mientras que en ratones tratados con linfocitos T NT los tumores crecieron de forma exponencial, no se observó crecimiento en ratones tratados con linfocitos T CD19-ENG.

**XIII. EJEMPLO 6: LA FUNCIÓN DE LOS LINFOCITOS T DE ACOPLAMIENTO SE MEJORA EXPRESANDO MOLÉCULAS COESTIMULADORES EN LA SUPERFICIE CELULAR DE LINFOCITOS T O IL15**

**Generación de linfocitos T CD19-ENG que coexpresa moléculas coestimuladoras (FIG. 22).**

La coestimulación se puede proporcionar expresando moléculas coestimuladoras sobre la superficie de los linfocitos T. Una vez que se han activado los linfocitos T, expresan los correspondientes ligandos, dando como resultado una activación sostenida de linfocitos T. Se generó un vector de retrovirus que codifica 41BBL y CD80 separados por un IRES (**FIG. 22A**). La transducción 'doble' de linfocitos T con vectores retrovirales que codifican moléculas de acoplador o CD80 y 41BBL dieron como resultado la expresión de CD80 y 41BBL en la superficie celular de linfocitos T al contrario que los linfocitos T que solo se transdujeron con el retrovirus que codifica la molécula del acoplador (**FIG. 22B**). Hubo una producción consistente de IL2 en presencia de células diana que no expresan moléculas coestimuladoras (**FIG. 22B**), destacando que es factible introducir modificaciones genéticas adicionales en linfocitos T para mejorar su función.

**La generación de linfocitos T que expresa EphA2-ENG e IL15 (FIGS. 23 y 24).**

Se generaron linfocitos T EphA2-ENG/IL15 mediante transducción 'doble' de linfocitos T con vectores de retrovirus que codifican moléculas de acoplador o IL15. Tras la estimulación con células tumorales positivas en EphA2, los linfocitos T EphA2-ENG/IL15 produjeron IFN $\gamma$ , IL2 e IL15 (**FIG. 23**). Hubo una elevada proliferación de estimulación de linfocitos T EphA2-ENG/IL15 en comparación con los linfocitos T que solo expresan EphA2-ENG (**FIG. 24**), destacando que es factible introducir genes adicionales, además de los genes que codifican las moléculas coestimuladoras, en linfocitos T para mejorar su función.

**XIV. EJEMPLO 7: RESUMEN DE DETERMINADAS REALIZACIONES**

En el presente documento se describe el desarrollo y la caracterización de una nueva clase de linfocitos T que secreta acopladores de linfocitos T biespecíficos, y se demuestra que los linfocitos T que secretan acopladores específicos de antígeno se dirigen eficazmente a células positivas en antígeno. Estos linfocitos T de acoplamiento producen citocinas inmunoestimuladoras y proliferan de una forma específica de antígeno, inducen citólisis tumoral cuando se cocultivan con dianas positivas en antígeno, redirigen linfocitos T espectadores hacia células tumorales positivas en antígeno y tienen una potente actividad antitumoral *in vivo*.

La modificación genética de los linfocitos T con CAR o TCR diseñados genéticamente es una estrategia atractiva para generar rápidamente linfocitos T específicos de antígeno. Sin embargo, ni los linfocitos T CAR ni los linfocitos T con TCR diseñados genéticamente han demostrado ser capaces de redirigir los linfocitos T espectadores hacia las células cancerosas. Varios grupos de investigadores han desarrollado anticuerpos biespecíficos, incluyendo acopladores de linfocitos T biespecíficos (BiTE), anticuerpos de redireccionamiento de doble afinidad (DART) y diacuerpos, para redirigir linfocitos T residentes hacia células tumorales. Entre estos, el BiTE específico de CD19, blinatumomab, ha demostrado resultados alentadores en estudios clínicos de fase I y II para pacientes con neoplasias sanguíneas. Sin embargo, los BiTEs se tienen que dar como una infusión continua, que se puede asociar con toxicidades sistémicas. Además, como en los MAbs regulares, los BiTEs carecen de biodistribución activa o autoamplificación una vez administrados. Además, no penetran en tejidos lisos, lo que podría explicar de lejos la limitada actividad de los BiTEs en humanos con tumores sólidos.

Los linfocitos T que secretan moléculas de acoplador pueden superar muchas limitaciones de MAbes biespecíficos dado que son capaces de persistir y expandirse tras la infusión, viajar activamente hacia sitios tumorales y aumentar la expresión transgénica tras la activación. De hecho, los linfocitos T de acoplamiento se expandieron *in vivo*, obviando la necesidad de infusión continua de moléculas de acoplador. Una vez activado, las células de acoplador

5 aumentaron la producción de las moléculas de acoplador, dando como resultado una capacidad mejorada para redirigir los linfocitos T espectadores hacia las células tumorales. En aspectos particulares, estas características favorables de los linfocitos T dan como resultado altas concentraciones de moléculas de acopladores en sitios tumorales a la vez que se minimiza la exposición sistémica, que puede ser tóxica.

10 *In vivo*, los linfocitos T de acoplamiento tuvieron una actividad antitumoral potente en 4 modelos de animales, lo que demuestra su gran potencial terapéutico.

En conclusión, los linfocitos T de acoplamiento presentan una nueva clase de linfocitos T específicos de antígeno con la única capacidad de redirigir linfocitos T acopladores hacia células tumorales de una forma dependiente de

15 antígeno. Los linfocitos T de acoplamiento indujeron la regresión de tumores establecidos en modelos de xenoinjerto locorregionales y sistémicos y, por lo tanto, son útiles para mejorar la inmunoterapia actual para el cáncer.

## XV. EJEMPLO 8: MATERIALES Y MÉTODOS

20 Los presentes ejemplos describen aspectos específicos pero ejemplares relacionados con EphA2. El experto en la materia reconoce que tales ejemplos se pueden extrapolar a otras realizaciones y dentro de la experiencia habitual del experto en la materia.

### A. Líneas de células tumorales

25 La línea celular de cáncer de pulmón A549, la línea celular de leucemia K562 y la línea de glioblastoma U373 se encargaron de la American Type Culture Collection (ATCC). La línea celular de leucemia BV173 se encargó del Leibniz Institute DSMZ - Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (Braunschweig, Alemania). La generación de células K562 que expresan EphA2 de humano (K562-EphA2) y las células U373, A549 y BV173 que expresan fLuc se describieron anteriormente.

### B. Construcción de vectores de retrovirus que codifican ENG específicos de EphA2 y específicos de CD19

35 La construcción del acoplador (ENG) específico de EphA2 que contiene el péptido líder de cadena pesada de inmunoglobulina, el scFv 4H5 específico de EphA2, un enlazador corto de serina-glicina, y un scFv específico de CD3 que deriva de OKT3 se describe en alguna parte del presente documento. El acoplador específico de EphA2 se subclonó en pSFG-IRES-mOrange. El acoplador específico de CD19, que contiene el péptido líder de cadena pesada de inmunoglobulina, el scFv (FMC63) específico de CD19, un enlazador corto de serina-glicina y un scFv específico de CD3 que deriva de OKT3 se sintetizó por Invitrogen (Carlsbad, CA) y se subclonó en pSFG-IRES-

40 mOrange. Se generaron partículas de retrovirus pseudotipadas a RD114.

### C. Generación de linfocitos T ENG

45 Los linfocitos T que expresan CAR o ENG se generaron tal como se describe anteriormente. Antes de la recogida de sangre, se obtuvo el consentimiento informado de los donantes sanos de acuerdo con los protocolos aprobados por la Junta de Revisión Institucional de Baylor College of Medicine. Las PBMC se estimularon en placas de 24 pocillos tratadas con cultivo no tisular y recubiertas con anticuerpos OKT3 y CD28. Se añadió IL2 humana (proleucina, Chiron) a los cultivos el día 2, y el día 3 se transdujeron los linfocitos T con partículas de retrovirus en placas recubiertas con RetroNectin (Clontech) en presencia de IL2. Los linfocitos T se expandieron posteriormente con IL2.

50 Los linfocitos T NT se activaron con OKT3/CD28 y se expandieron en paralelo con IL2.

### D. Citometría de flujo

55 La expresión de mOrange se detectó mediante análisis de FACS. La expresión en superficie de CAR sobre linfocitos T se analizó usando un anticuerpo CH2CH3 Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Para el inmunofenotipado, las células se tiñeron con los anticuerpos monoclonales CD3-PerCP, CD4-FITC y CD8-FITC (BD Biosciences). Los controles de isotipo fueron inmunoglobulina G1-isotiocianato de fluoresceína (IgG1-FITC, BD Biosciences), IgG1-proteína de clorofila peridina (IgG1-PerCP, BD Biosciences) e isotipo Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Para cada muestra, se analizaron 20.000 células mediante un instrumento FACSCalibur (BD Biosciences) usando el programa informático Cell Quest (BD Biosciences).

60

### E. Análisis funcional *ex vivo* de linfocitos T

65 Los linfocitos T EphA2-ENG, CD19-ENG y NT se colocaron en placas en una proporción de 10:1 con células tumorales. Se midió la producción de IFN $\gamma$  e IL2 tras 24 horas de cocultivo usando ELISA según las instrucciones del fabricante (R&D Systems). Los ensayos convencionales de liberación de cromo (<sup>51</sup>Cr) se realizaron tal como se ha

descrito anteriormente.

#### F. Ensayos transpocillo

- 5 Las células U373, U373.eGFP.ffLuc o BV173.ffLuc se colocaron sobre pocillos inferiores de placas de 24 pocillos. Después de 24 horas, se añadieron linfocitos T NT a los pocillos inferiores y los linfocitos T EphA2-ENG o CD19-ENG se añadieron a pocillos de inserción transpocillo (6,5 mm de diámetro, 0,4 µm de poro, policarbonato, Corning Inc). Después de 48 horas, las células tumorales viables se detectaron mediante tinción con cristal violeta para U373 o mediante ensayo de luciferasa para células U373.eGFP.ffLuc o BV173.ffLuc.

10

#### G. Ensayo MTS

Las células U373 se colocaron en placas de 96 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^4$  células por pocillo. Después de 24 horas, se añadieron linfocitos T a las placas. Tras 48 horas de cocultivo, los linfocitos T no adherentes se eliminaron y las células viables se detectaron mediante el ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) (CellTiter 96, ensayo de proliferación de células en solución acuosa, Promega).

15

#### H.PCR cuantitativa en tiempo real

- 20 El ARN se extrajo de los linfocitos T usando el Mini kit RNeasy (Qiagen). La cuantificación relativa del ARNm de EphA2-ENG se hizo usando los reactivos SYBR Green (Qiagen).

#### I. Modelos animales

- 25 Todos los experimentos con animales siguieron un protocolo aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Baylor College of Medicine. Los experimentos se realizaron tal como se describe anteriormente con pequeñas modificaciones.

- 30 *Modelo intracraneal:* Los ratones ICR-SCID macho de 8 a 12 semanas de vida se encargaron de Taconic (IcrTac:ICR-Prkdcscid; Fox Chase C.B-17 SCID ICR; Taconic). Brevemente, las células U373.eGFP.ffLuc ( $1 \times 10^5$  en 2,0 µl) se inyectaron a 3 mm de profundidad del bregma, que se corresponde con el centro del núcleo caudado derecho durante 5 minutos. Siete días después de la inyección celular, los animales se trataron con  $2 \times 10^6$  linfocitos T NT o ENG del mismo donante en 2 µl hacia las mismas coordenadas del tumor. Los fotones emitidos desde las células tumorales que expresan luciferasa se cuantificaron usando el programa informático Living Image (Caliper Life Sciences). Se dibujó una región continua de interés sobre la región tumoral y la intensidad de la señal se midió como el total de fotones/segundos/cm<sup>2</sup>/estereorradianes (f/s/cm<sup>2</sup>/sr). Inicialmente se obtuvieron imágenes de los animales cada dos días y una vez a la semana desde entonces. Los ratones se sacrificaron cuando la radiancia del tumor fue  $>1 \times 10^9$  en dos ocasiones o cuando alcanzaban los criterios de eutanasia (déficits neurológicos, pérdida de peso, señales de distrés) de acuerdo con el Centro de Medicina Comparativa en el Baylor College of Medicine.

40

- 45 *Modelo de tumor sistémico A549 (actividad antitumoral):* Los ratones SCID Beige de 8 a 12 semanas de vida se encargaron de Charles River (CB17.Cg-PrkdcscidLystbg/Crl; Fox Chase SCIDR Beige mouse; Charles River Laboratories International, Inc.). Se inyectaron  $2,5 \times 10^6$  células A549.eGFP.ffLuc en PBS por vía i.v. en el día 0. Siete, 14 y 21 días después de la inyección de células tumorales, los ratones se trataron por vía i.v. con  $1 \times 10^7$  linfocitos T CD19-ENG o linfocitos T EphA2-ENG. Todos los animales recibieron una dosis i.p. de IL2 (1.500 U) el día de las inyecciones de linfocitos T. Los animales no tratados sirvieron como controles. Se obtuvieron imágenes de los animales tal como se describe anteriormente. Los animales se sacrificaron cuando alcanzaron los criterios de eutanasia de acuerdo con el Centro de Medicina Comparativa en el Baylor College of Medicine.

50

- 55 *Modelo de tumor sistémico A549 (expansión y persistencia de linfocitos T):* Para determinar la expansión y la persistencia de los linfocitos T EphA2-ENG, los ratones SCID Beige macho de 8 a 12 semanas de edad se inyectaron por vía i.v. con  $2,5 \times 10^6$  células A549 en PBS en el día 0. En el día 7 tras la exposición al tumor, 5 ratones portadores de tumor y 5 controles fueron inyectados por vía i.v. con una mezcla de  $5 \times 10^6$  linfocitos T EphA2 ENG que expresan eGFP.ffLuc y  $5 \times 10^6$  linfocitos T NT. Todos los ratones recibieron una dosis i.p. de IL2 (1.500 U), y la expansión y la persistencia de los linfocitos T se controló mediante obtención de imágenes seriadas de bioluminiscencia. Para determinar la expansión y la persistencia de los linfocitos T espectadores, se inyectó a los ratones SCID Beige de 8 a 12 semanas de edad por vía i.v. con  $2,5 \times 10^6$  células A549 en el día 0. En el día 7 tras la exposición al tumor, los ratones portadores del tumor se inyectaron por vía i.v. con una mezcla de  $5 \times 10^6$  linfocitos T EphA2 ENG y  $5 \times 10^6$  linfocitos T que expresan eGFP.ffLuc o una mezcla de  $5 \times 10^6$  linfocitos T CD19 ENG y  $5 \times 10^6$  linfocitos T que expresan eGFP.ffLuc (5 ratones por grupo). Todos los ratones recibieron una dosis i.p. de IL2 (1.500 U), y la expansión y la persistencia de los linfocitos T se controló mediante obtención de imágenes seriadas de bioluminiscencia.

60

#### J. Análisis estadístico

- 65 Se usó el programa informático GraphPad Prism 5 (GraphPad software, Inc.) para el análisis estadístico. Los datos

de medida se presentaron como la media  $\pm$  la desviación típica (DT). Para la comparación entre dos grupos, se usó el test de la t de Student con dos colas. Para la comparación de tres o más grupos, los valores se analizaron mediante ANOVA de una vía con el posterior test de Bonferroni. Se realizó el análisis de regresión lineal para comparar la actividad antitumoral de linfocitos T ENG y CAR y de linfocitos T ENG activados y no activados. El nivel de significación usado fue  $p < 0,05$ . Para los experimentos en ratones, se planificaron 5 ratones para detectar un tamaño de efecto grande de 2, que proporcionaba al menos un 80% de potencia con un 5% de error de tipo I. Aunque no se llevó a cabo una aleatorización formal, se eligió de forma aleatoria una jaula de 5 ratones. La supervivencia, determinada a partir del momento de la inyección de células tumorales, se analizó mediante el método de Kaplan-Meier y mediante el test log-rank.

10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una célula que comprende un vector de polinucleótido que codifica una molécula bipartita que comprende un dominio de activación que se une a una o más moléculas de superficie celular y un dominio de reconocimiento de antígeno que se une a EphA2 y/o CD19, en donde el dominio de activación es un fragmento variable de cadena única (scFv) que reconoce CD3 y en donde la célula es un linfocito T o una célula NK.
- 10 2. La célula de la reivindicación 1, en donde el dominio de reconocimiento de antígeno comprende restos de anticuerpo scFv.
3. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el vector es un vector no vírico o vírico.
- 15 4. La célula de la reivindicación 3, en donde el vector vírico se selecciona del grupo que consiste en vector de lentivirus, de adenovirus, de retrovirus y de virus adenoasociado.
5. La célula de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el vector es un vector oncolítico.
- 20 6. Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en un método de tratamiento de un individuo con cáncer, comprendiendo el método la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de las células al individuo.
7. La célula de la reivindicación 6 para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el cáncer es positivo para EphA2 o positivo para CD19.
- 25 8. La célula de la reivindicación 6 o 7 para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde el vector se selecciona del grupo que consiste en vector de lentivirus, de adenovirus, de retrovirus y de virus adenoasociado.
- 30 9. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde al individuo se le proporciona una terapia de cáncer adicional.
- 35 10. La célula de la reivindicación 9 para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la terapia de cáncer adicional es cirugía, radiación, quimioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia o una combinación de las mismas.
- 40 11. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer de ovario, cáncer del endometrio, cáncer de cuello de útero, cáncer de riñón, cáncer gástrico, cáncer del intestino delgado, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de vesícula biliar, cáncer de conducto biliar, cáncer de esófago, cáncer de las glándulas salivares, cáncer de la glándula tiroides o glioblastoma.
- 45 12. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde el dominio de reconocimiento de antígeno se une a CD19 y el cáncer es una neoplasia que expresa CD19, una neoplasia sanguínea que deriva del linaje de linfocitos B, o una neoplasia que expresa de forma anómala CD19.
- 50 13. Un vector de polinucleótido que codifica una molécula bipartita que comprende un dominio de activación que se une a una o más moléculas de superficie celular y un dominio de reconocimiento de antígeno que se une a EphA2 y CD19, en donde el dominio de activación es un fragmento variable de cadena única (scFv) que reconoce CD3.
14. El vector de la reivindicación 13, en donde el vector es un vector no vírico o vírico.
15. El vector de la reivindicación 14, en donde el vector vírico se selecciona del grupo que consiste en vector de lentivirus, de adenovirus, de retrovirus y de virus adenoasociado.

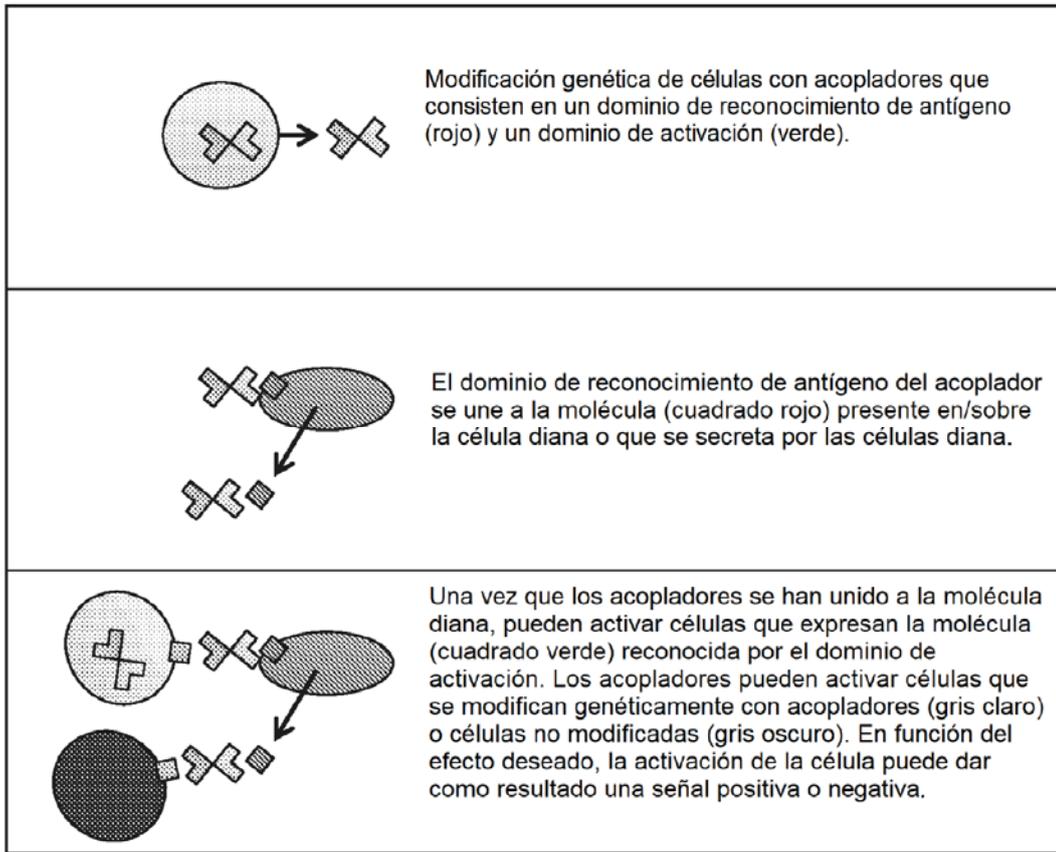
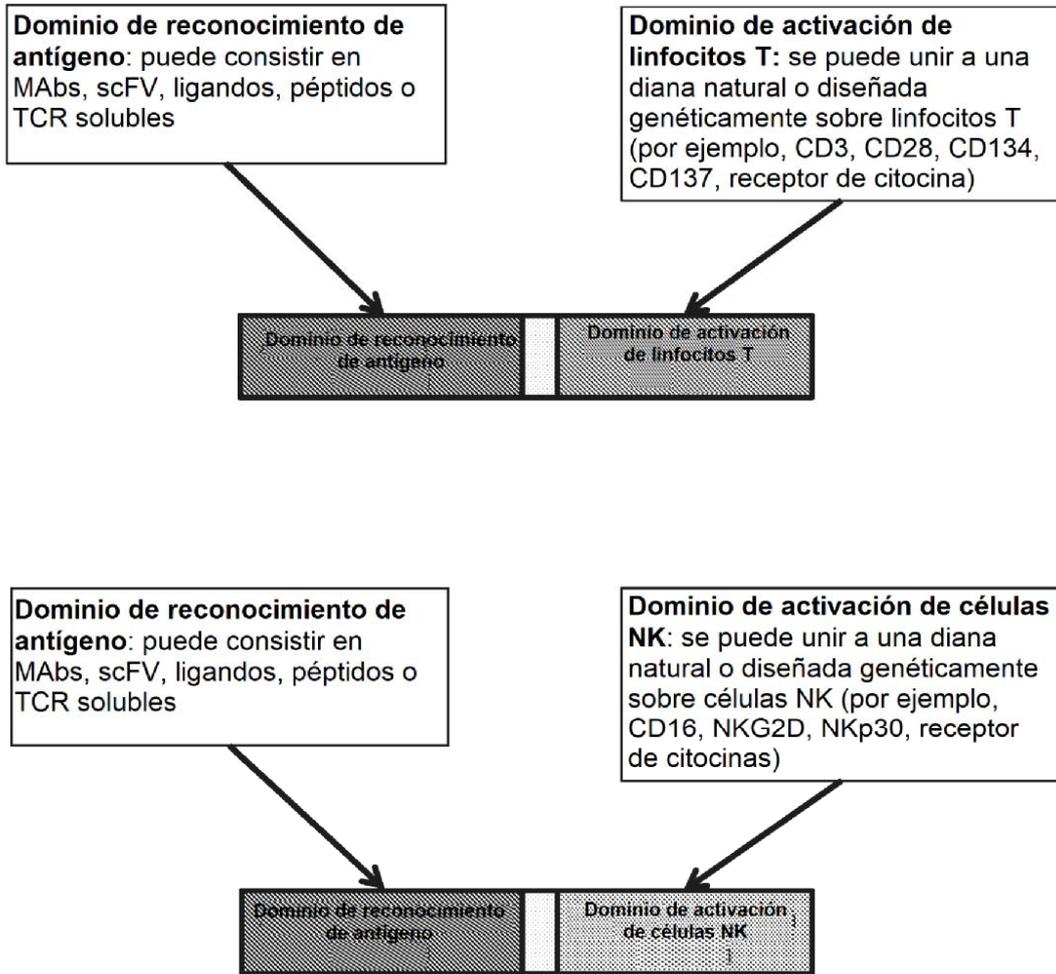


FIG. 1



**MAb:** anticuerpo monoclonal  
**scFv:** fragmento variable de cadena simple  
**TCR:** receptor de linfocitos T

FIG. 2

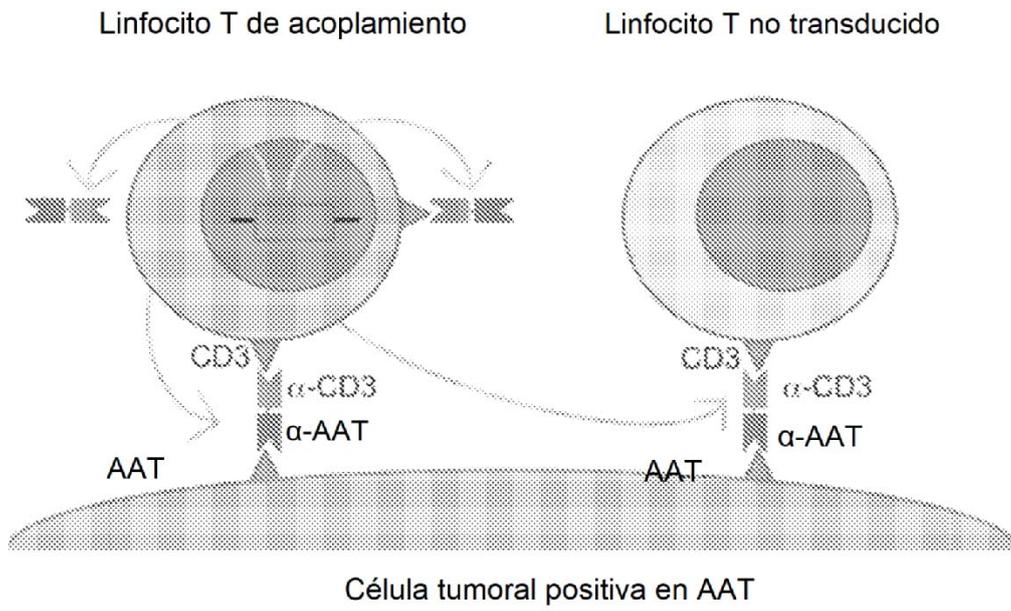


FIG. 3

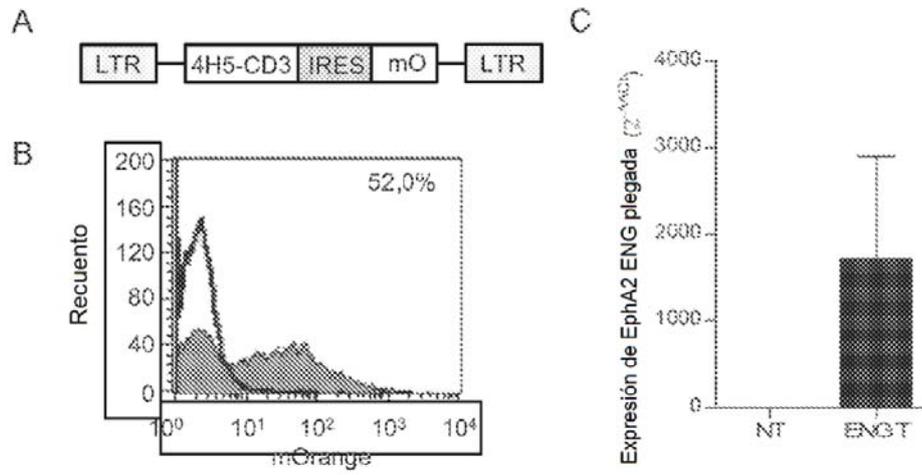


FIG. 4

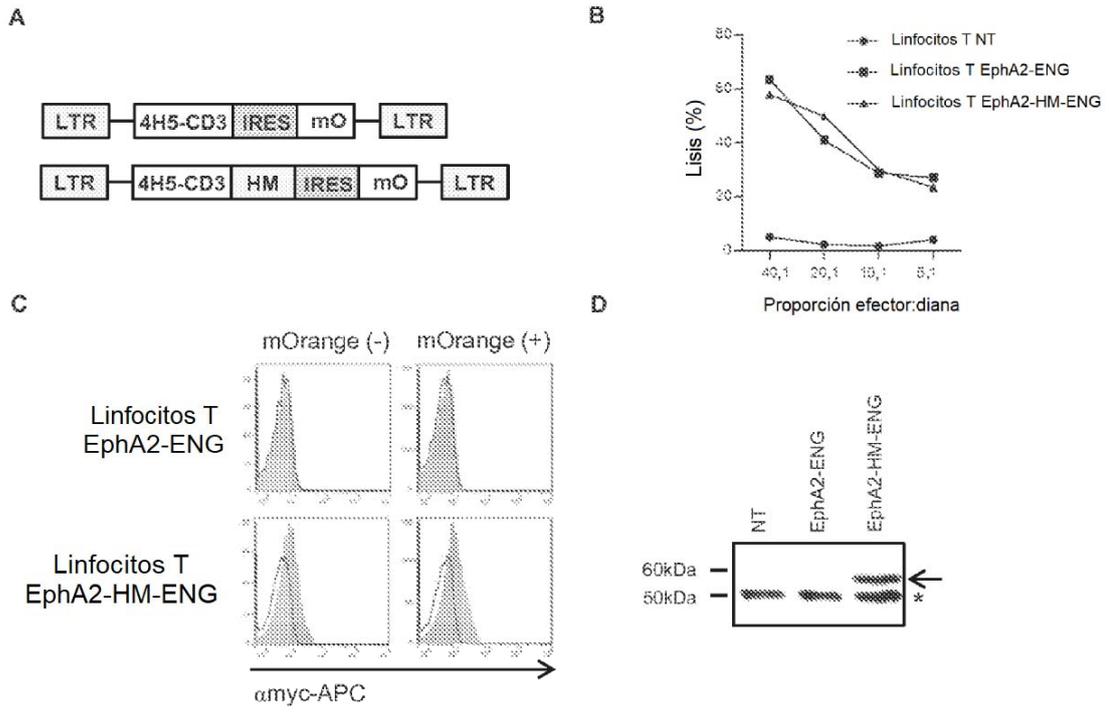


FIG. 5

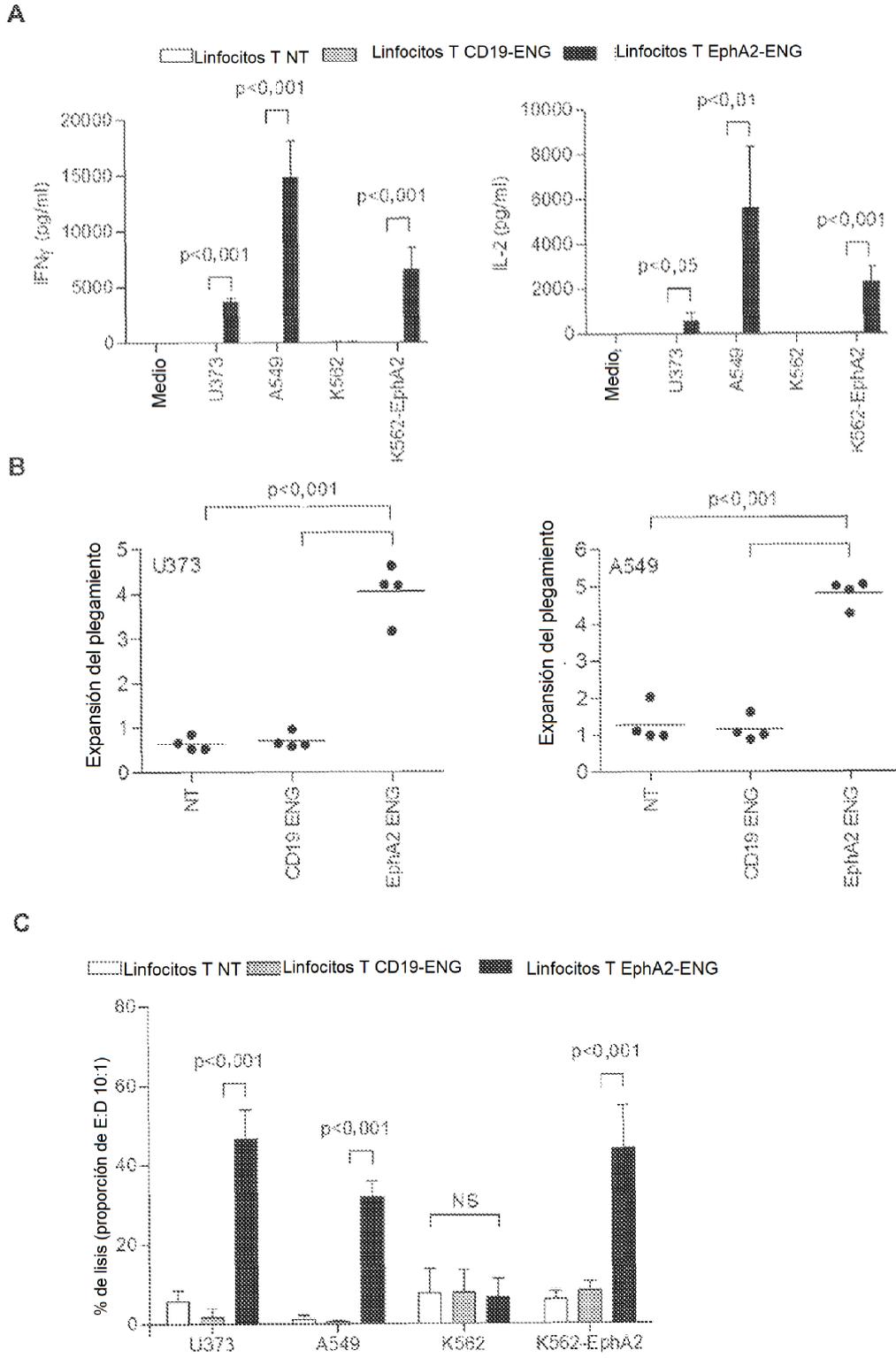


FIG. 6

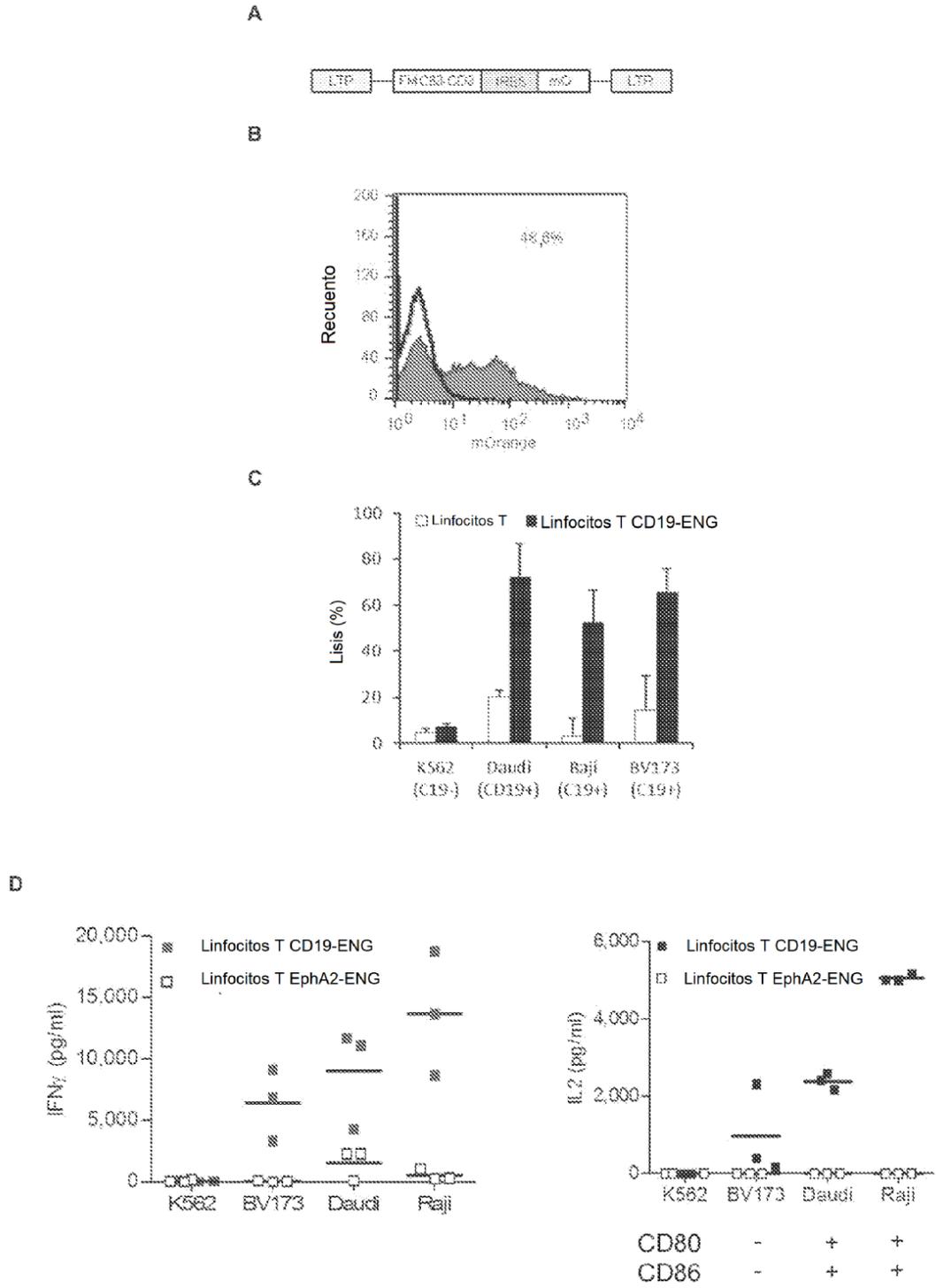


FIG. 7

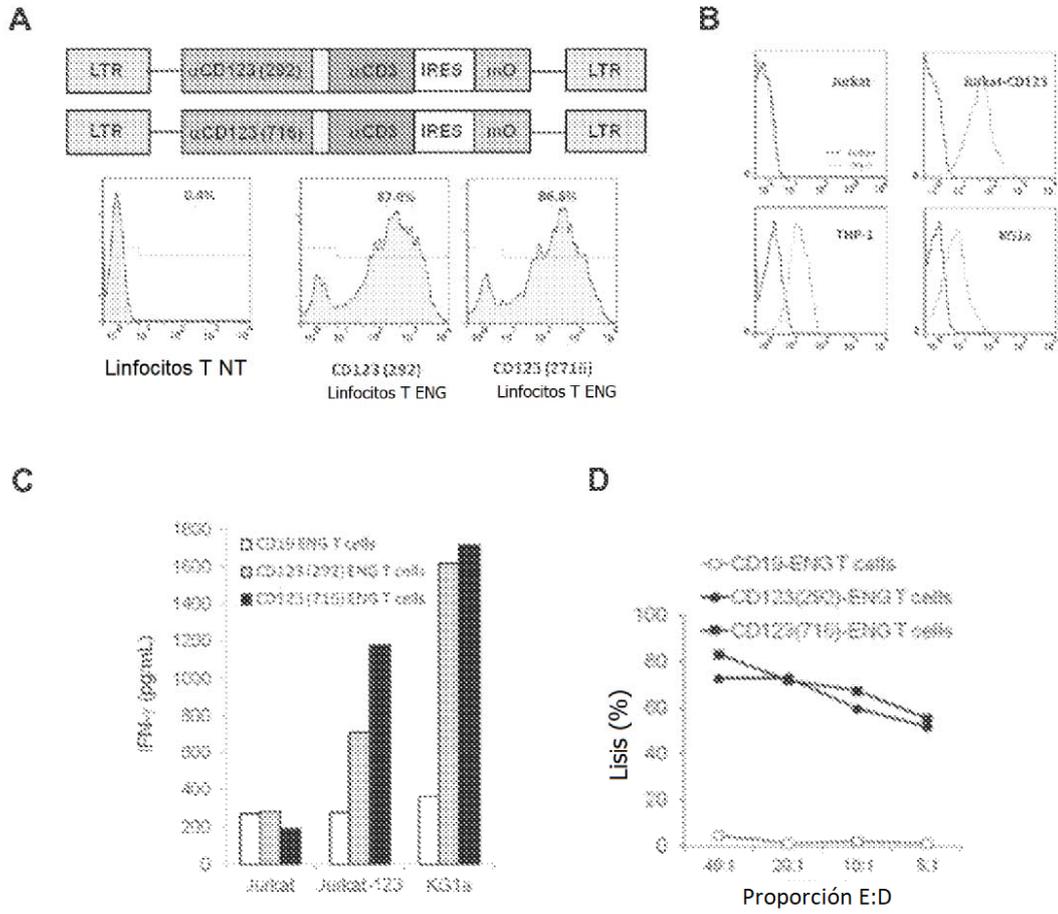


FIG. 8

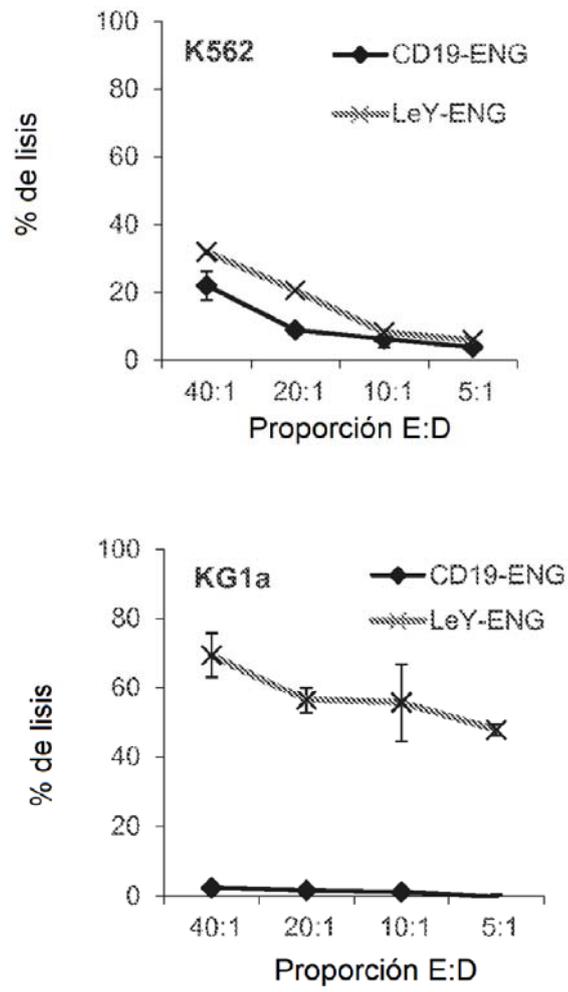


FIG. 9

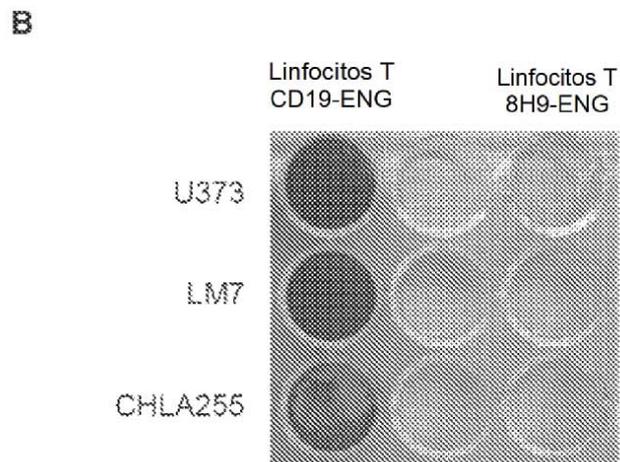
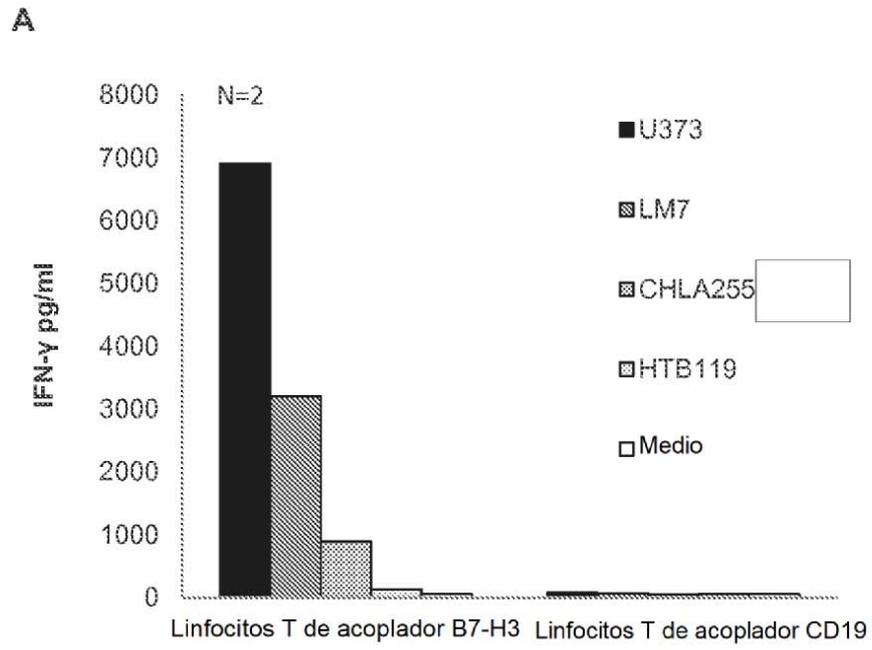


FIG. 10

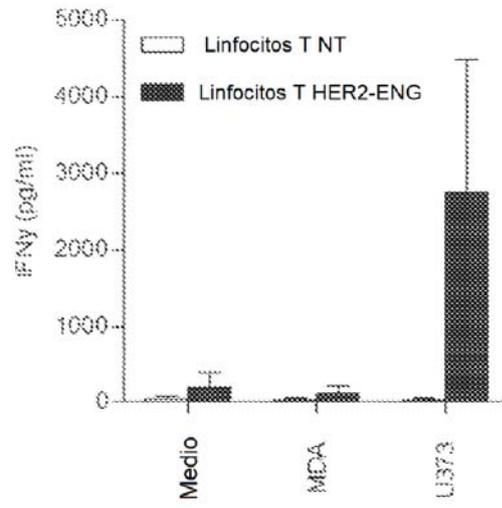


FIG. 11

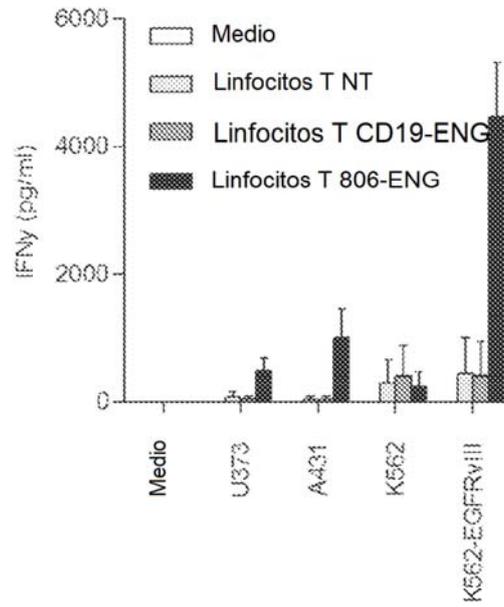
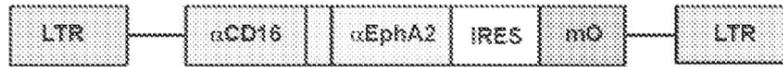


FIG. 12

A



B

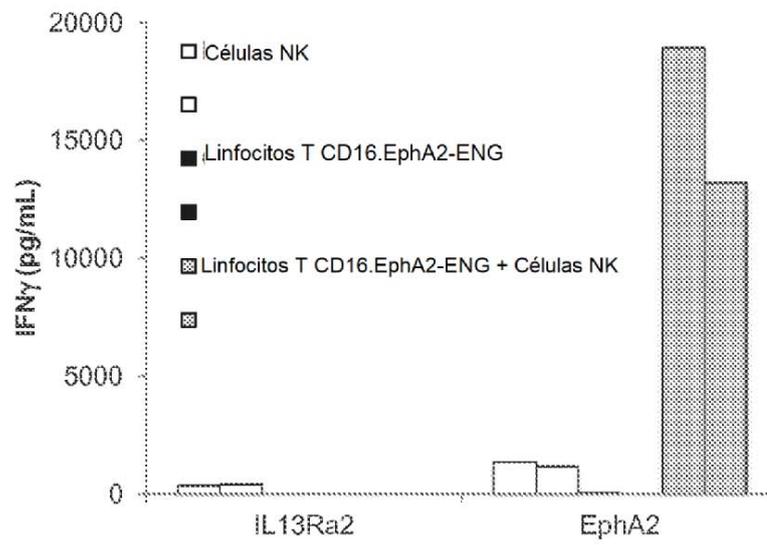


FIG. 13

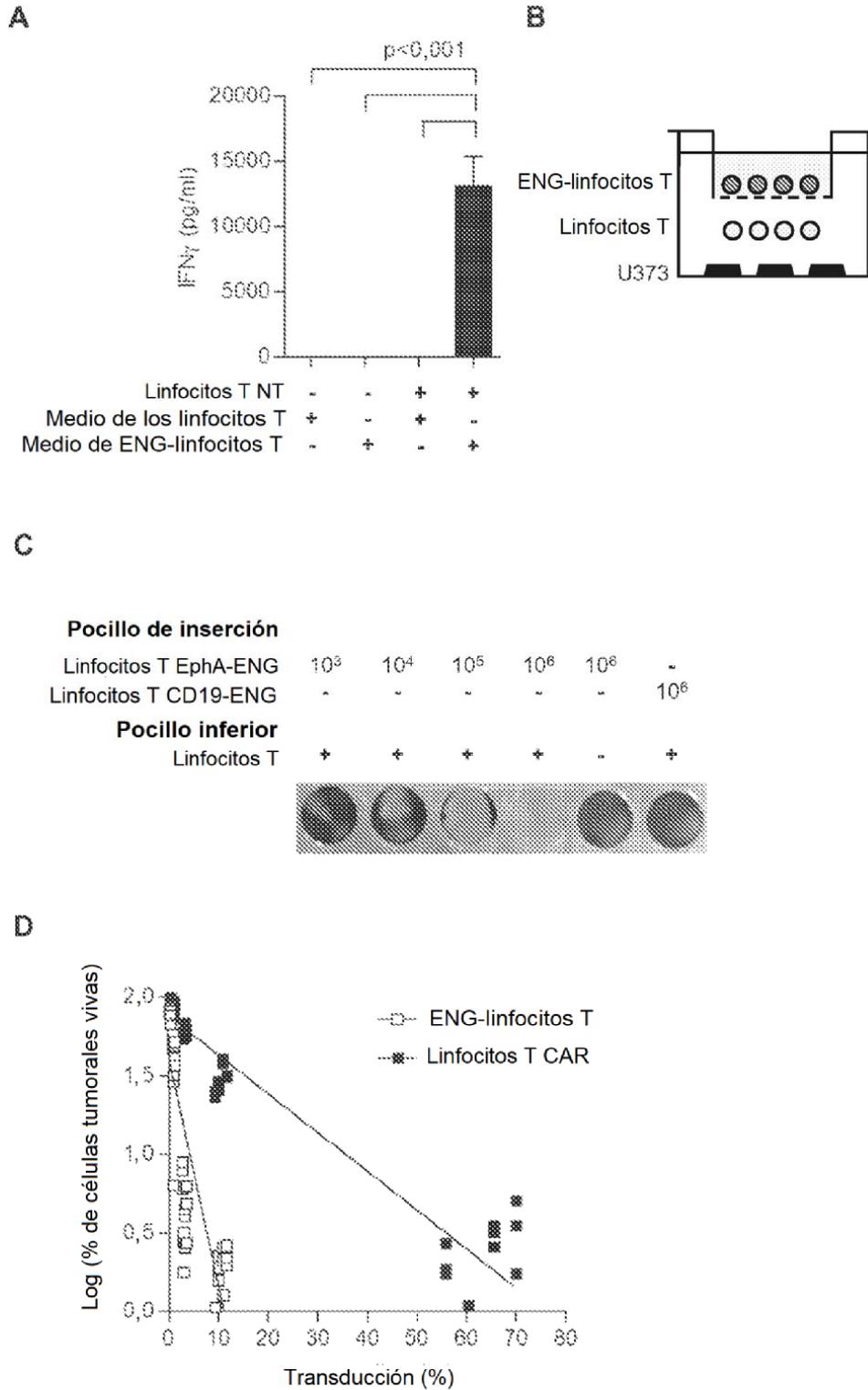


FIG. 14

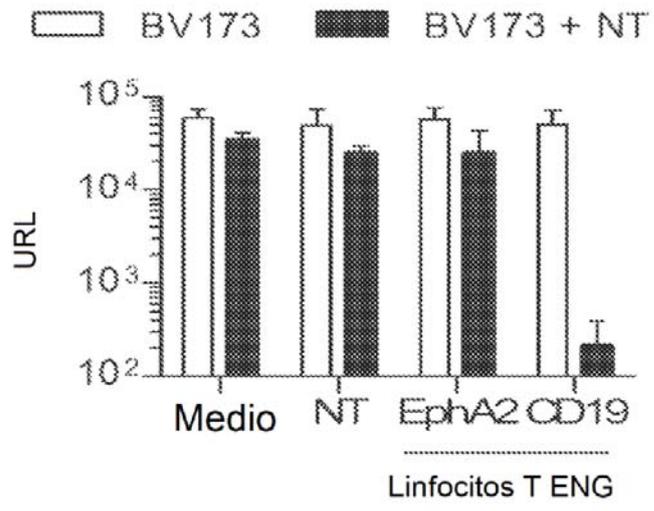


FIG. 15

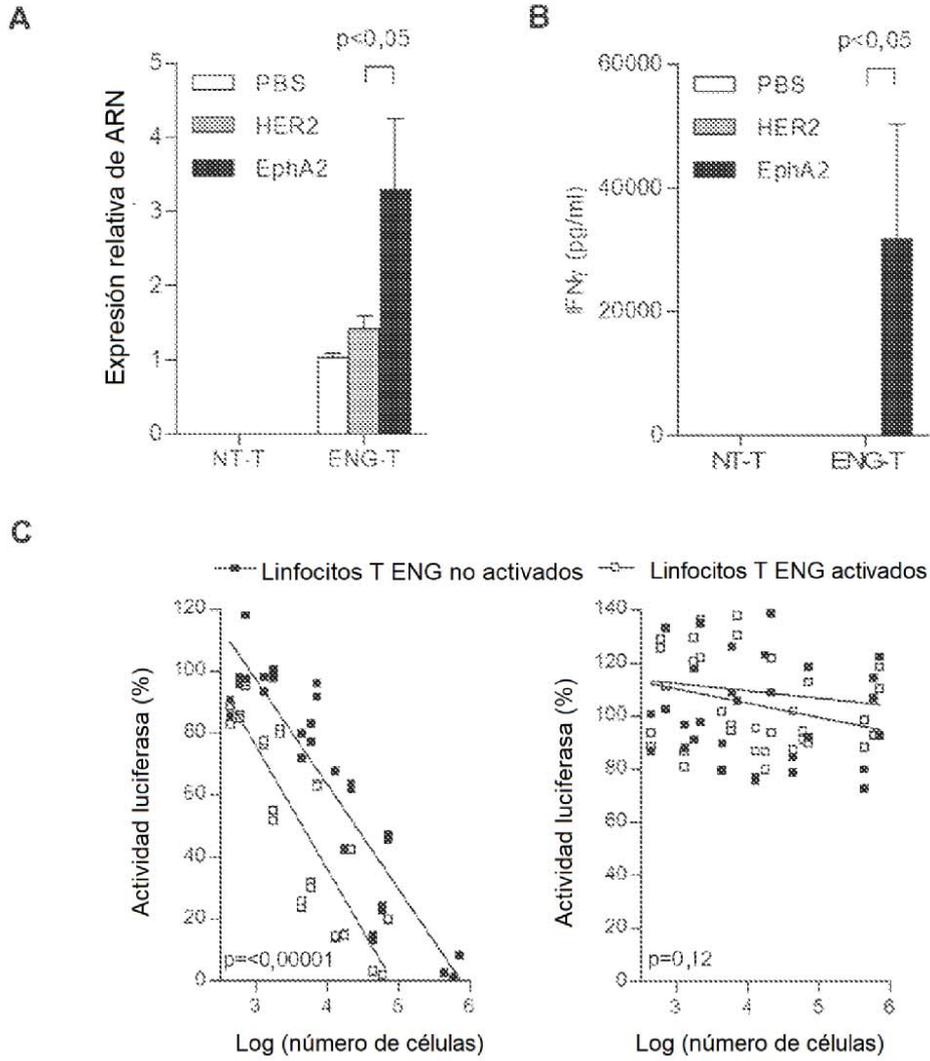


FIG. 16

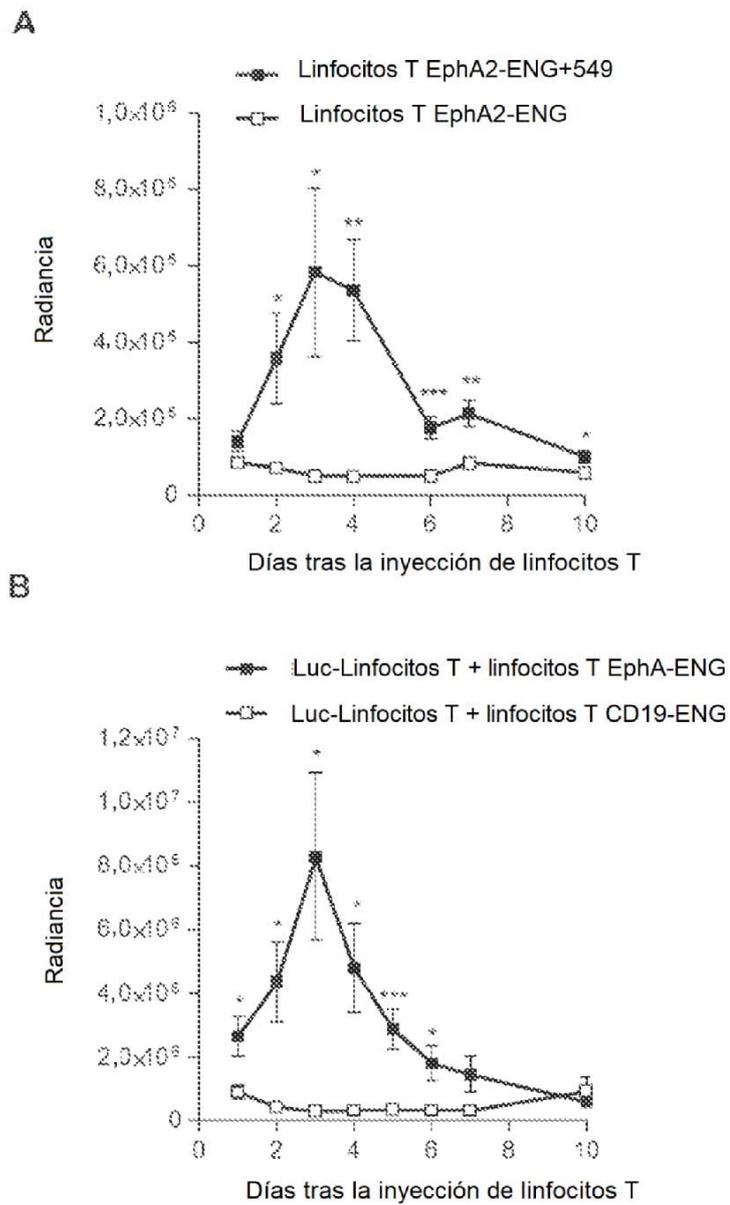
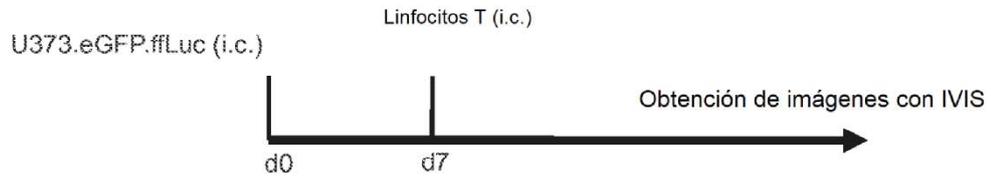
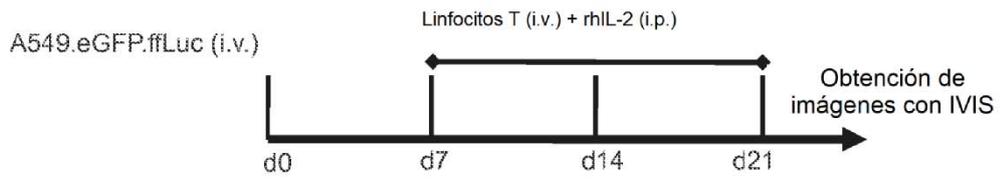


FIG. 17

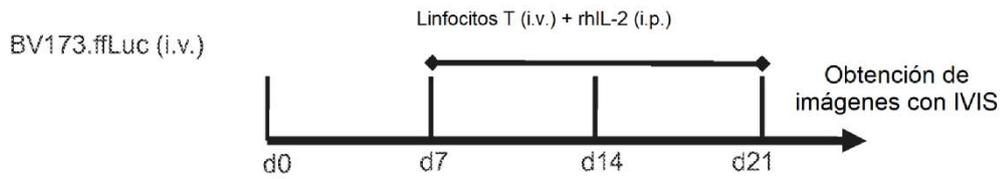
**Glioma**



**Cáncer de pulmón**



**Leucemia**



**Linfoma**

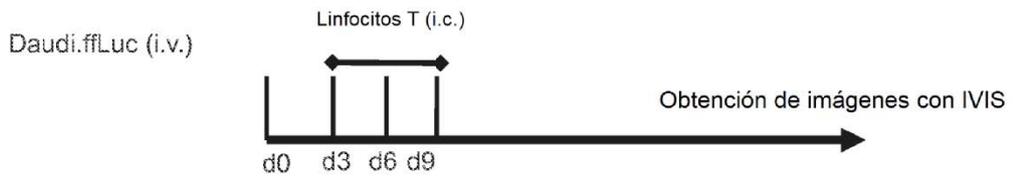


FIG. 18

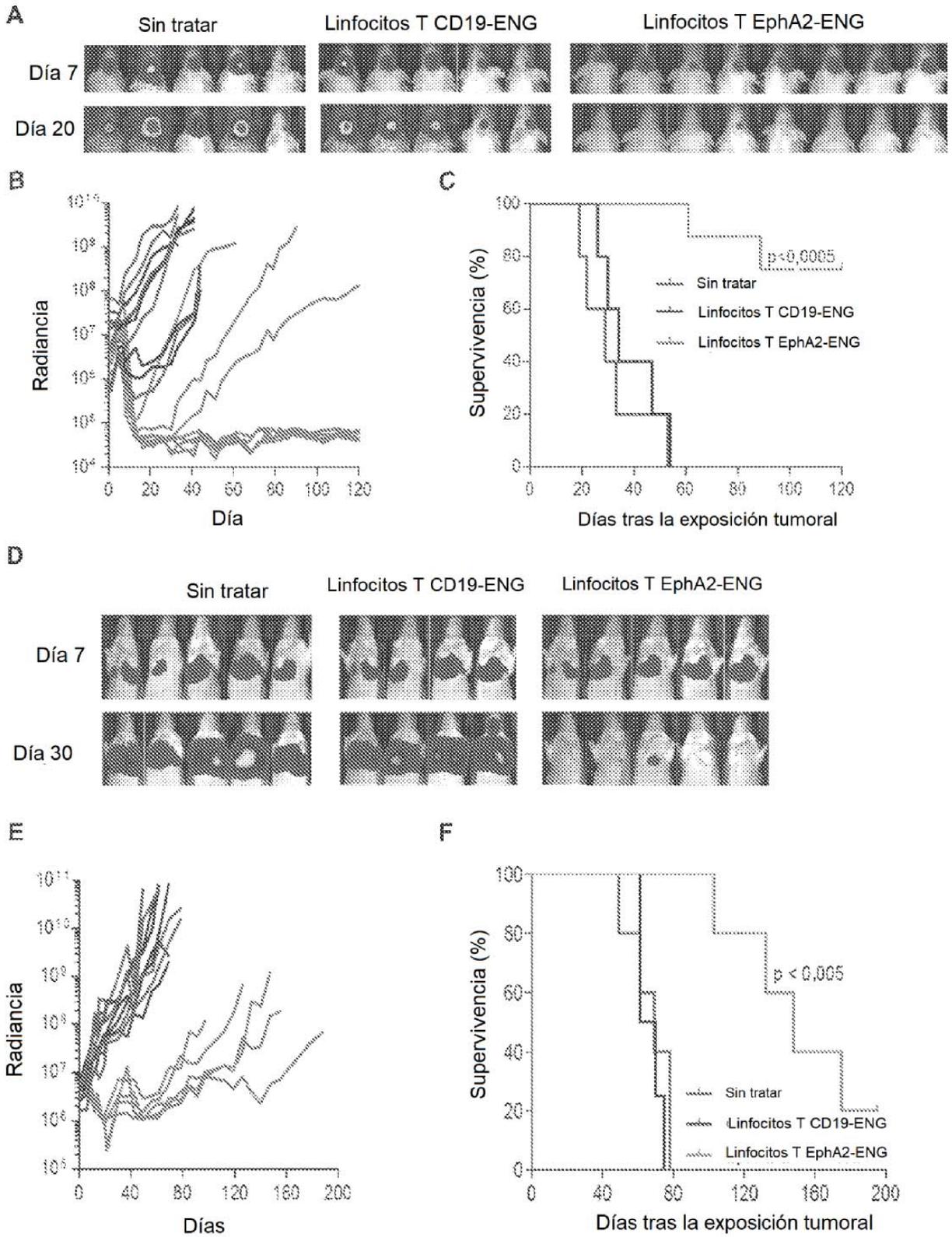
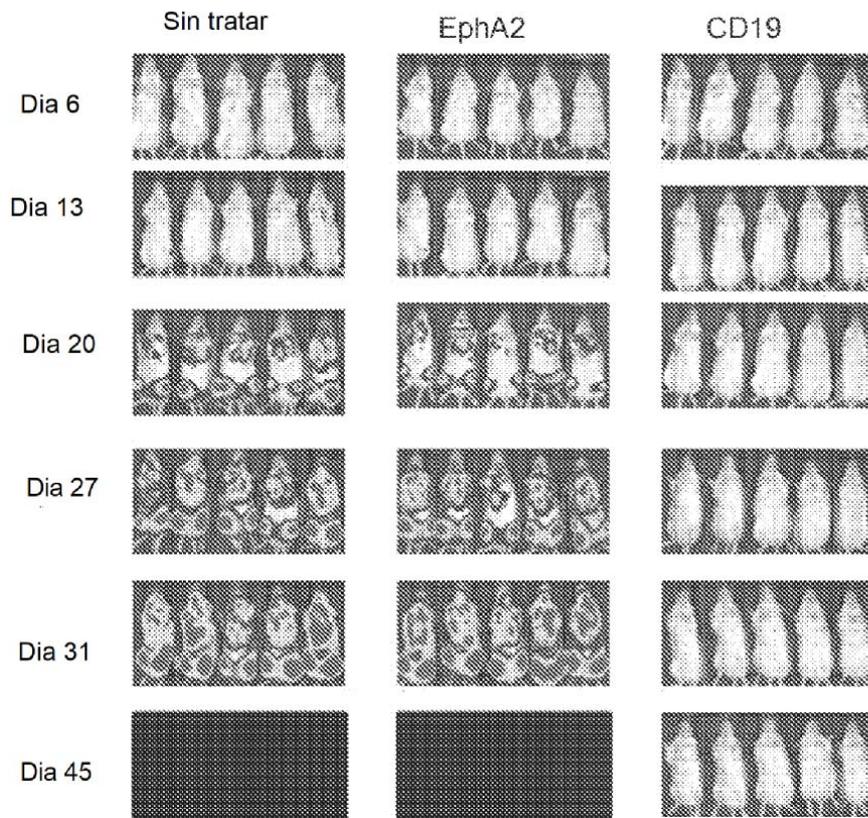


FIG. 19

A



B

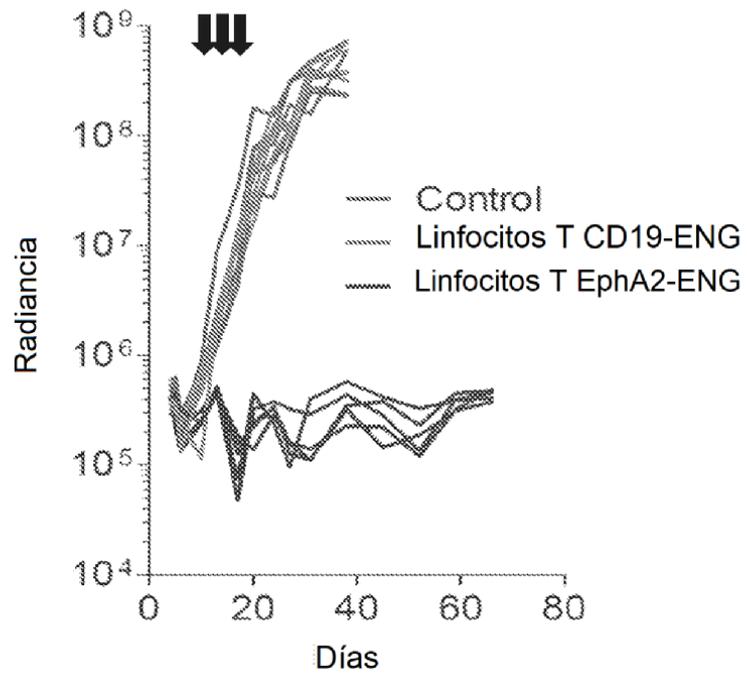


FIG. 20

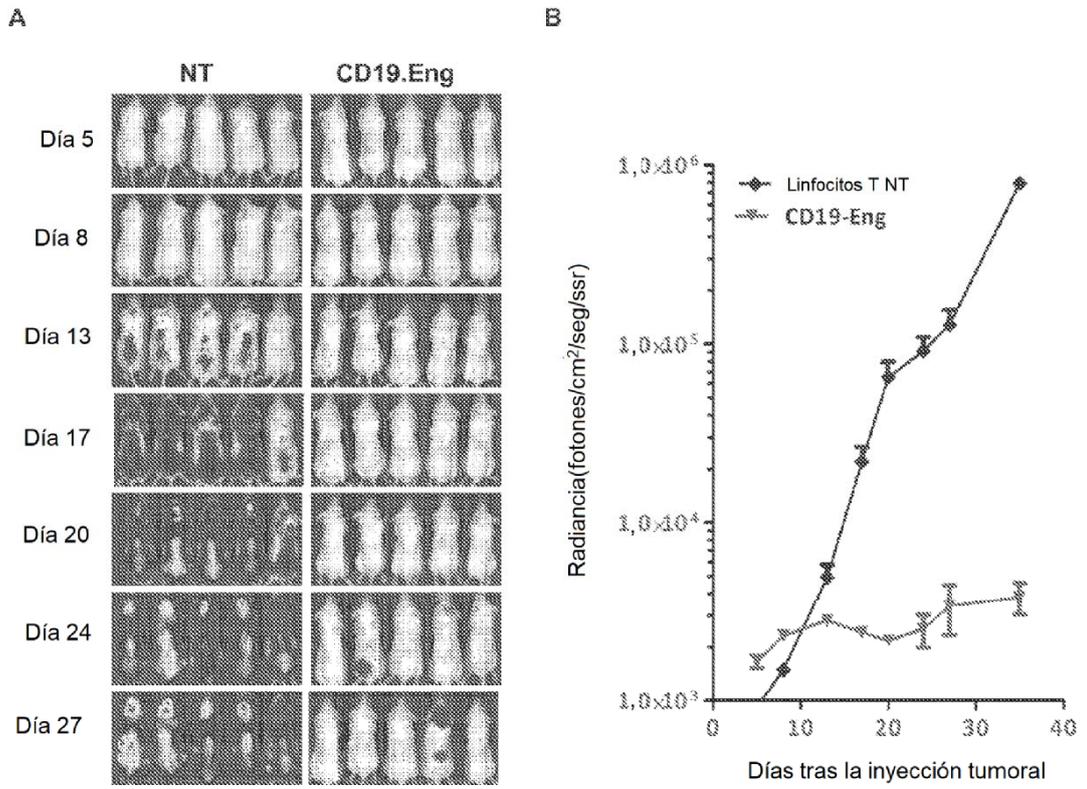
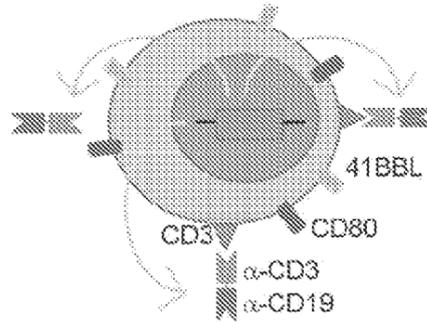
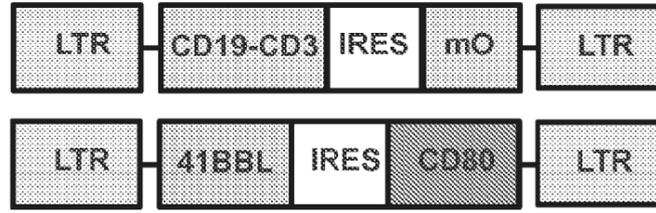
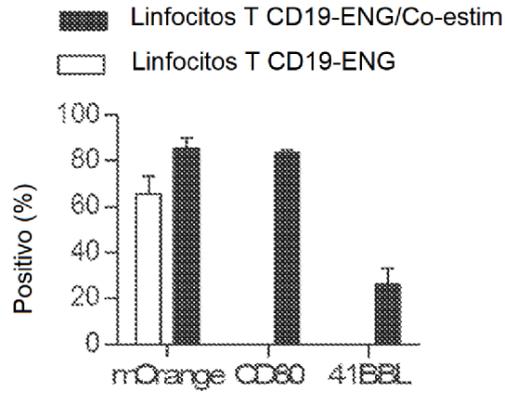


FIG. 21

A



B



C

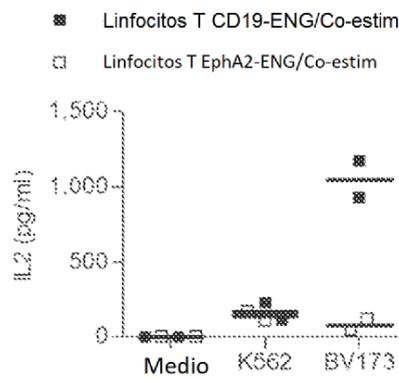
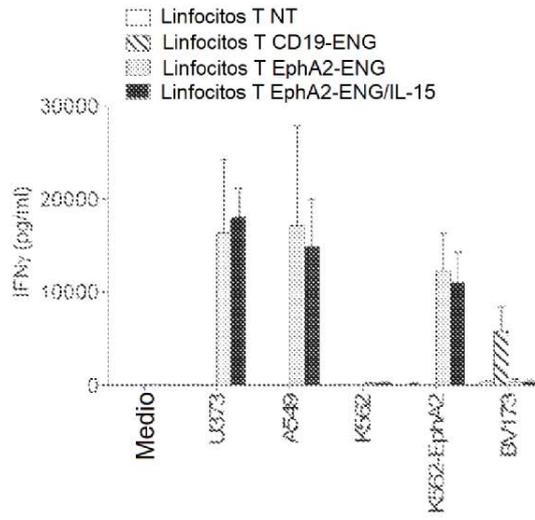
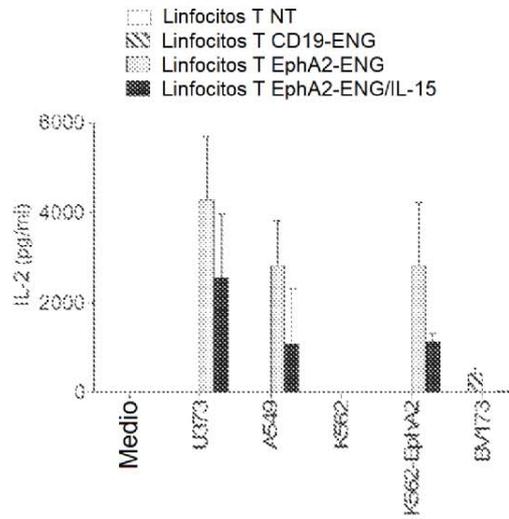


FIG. 22

A



B



C

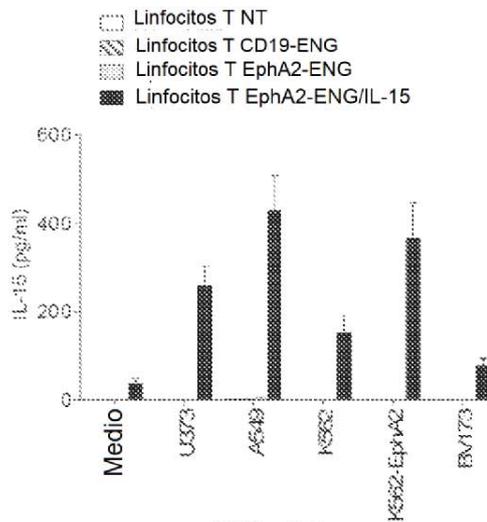


FIG. 23

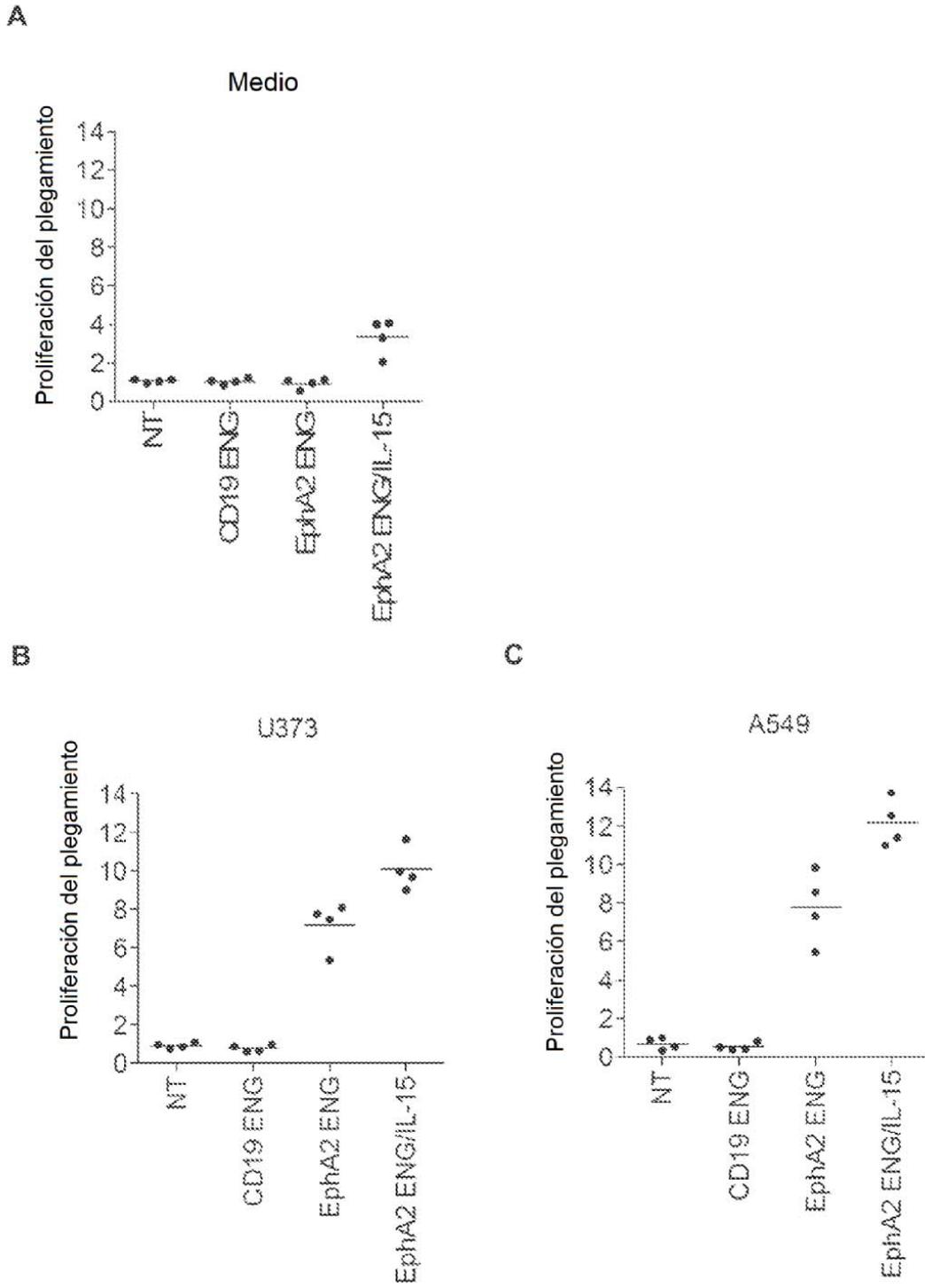


FIG. 24