

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 206**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/12** (2015.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2015** E 15196309 (7)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018** EP 3025719

54 Título: **Inmunoterapia combinada de receptores de reconocimiento de antígenos y células hematopoyéticas para el tratamiento de enfermedades**

30 Prioridad:

**26.11.2014 DE 102014224071**

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

**30.11.2018**

73 Titular/es:

**MILTENYI BIOTEC GMBH (100.0%)  
Friedrich-Ebert-Strasse 68  
51429 Bergisch Gladbach, DE**

72 Inventor/es:

**LUTTEROPP, MICHAEL;  
RICHTER, ANNE;  
KAISER, ANDREW;  
ASSENMACHER, MARIO y  
MILTENYI, STEFAN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 692 206 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

Inmunoterapia combinada de receptores de reconocimiento de antígenos y células hematopoyéticas para el tratamiento de enfermedades

5

Campo de la invención

10

La presente invención se refiere a receptores de reconocimiento de antígenos, por ejemplo, receptores de antígeno quimérico (CAR, por sus siglas en inglés) en células efectoras inmunitarias en combinación con la transferencia de células hematopoyéticas polimórficas o modificadas genéticamente para evitar o reducir los efectos secundarios de dicho receptor de reconocimiento de antígeno para su uso en el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer.

Antecedentes

15

Las inmunoterapias dirigidas se basan en el reconocimiento de antígenos, estructuras definidas en células enfermas o patógenos, por receptores inmunitarios que están ya sea solubles o presentes en la superficie de las células inmunitarias. El reconocimiento y la unión del antígeno por el receptor inmunitario desencadena usualmente funciones efectoras que conducen eventualmente a la destrucción del patógeno o célula respectiva. Los receptores inmunitarios solubles incluyen anticuerpos naturales o sintéticos, moléculas derivadas de anticuerpos y otras estructuras, las cuales tras unirse a un antígeno desencadenan el sistema del complemento o reclutan y en la mayoría de los casos activan células efectoras. La activación directa de la función efectora celular puede inducirse tras el reconocimiento de antígenos por receptores inmunitarios unidos a la membrana celular, tales como los receptores de células T (TCR, por sus siglas en inglés) presentes en los linfocitos T. Los TCR reconocen específicamente los péptidos antigénicos que se presentan en las moléculas del antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés) en células infectadas por virus o malignas, lo cual conduce a la activación y a la destrucción mediada por células T de las células objetivo. Las células T específicas de antígeno del repertorio natural que se produce *in vivo* pueden aplicarse para fines terapéuticos mediante el uso de diversos métodos. Alternativamente, las células dirigidas a antígenos pueden generarse a través de la inserción genética de receptores inmunitarios modificados por ingeniería genética, tales como TCR o CAR transgénicos en células T u otras células efectoras inmunitarias, lo que incluye las células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés). Comúnmente, los CAR comprenden una variable de fragmento de cadena única (scFv, por sus siglas en inglés) de un anticuerpo específico para un antígeno objetivo determinado acoplado a través de las regiones bisagra y transmembrana a los dominios citoplasmáticos de las moléculas de señalización de células T. Los restos de activación de linfocitos más comunes incluyen un dominio coestimulador de células T (por ejemplo, CD28, CD137, OX40, ICOS y CD27) junto con un resto activador de células T (por ejemplo, CD3 $\zeta$ ). La inmunoterapia adoptiva mediada por CAR permite que las células injertadas en CAR reconozcan directamente el antígeno deseado en las células objetivo de una manera no restringida por HLA.

20

25

30

35

40

45

50

55

El cáncer es un grupo amplio de enfermedades que involucran el crecimiento celular desregulado. En el cáncer, las células se dividen y crecen descontroladamente, lo que forma tumores malignos, e invaden las partes cercanas del cuerpo. Además, el cáncer puede diseminarse a partes más distantes del cuerpo a través del sistema linfático o del torrente sanguíneo. Existen más de 200 cánceres conocidos diferentes que afectan a los seres humanos. Mientras que hay buenas opciones de tratamiento disponibles para muchos tipos de cáncer, otros representan aún necesidades médicas no satisfechas. Los cánceres del sistema hematopoyético pueden dividirse aproximadamente en subtipos diferentes. Las leucemias afectan generalmente los órganos linfáticos primarios, que son la médula ósea así como también el timo, y surgen de poblaciones progenitoras hematopoyéticas. Por otro lado, los linfomas se derivan generalmente de linfocitos maduros y se originan a partir de órganos linfáticos secundarios. El tratamiento de primera línea actual para la mayoría de los cánceres hematopoyéticos involucra la administración de agentes quimioterapéuticos, radioterapia o una combinación de ambos. En muchos casos, dichas terapias se combinan o se siguen por la transferencia de células madre hematopoyéticas (HSCT, por sus siglas en inglés), donde el efecto de injerto frente a leucemia (GvL, por sus siglas en inglés) mediado por los linfocitos derivados del donante, especialmente las células T, puede conducir a la erradicación de las células cancerosas que sobrevivieron al precondicionamiento quimio o radioterapéutico y resultar en una remisión completa. En dependencia del tipo de malignidad hematológica, la condición de los pacientes y la disponibilidad de injertos de células madre hematopoyéticas, se realizan regularmente en las clínicas diversas versiones de HSCT. El efecto GvL deseado solo se logra en la HSCT alogénica, que al mismo tiempo se acompaña a menudo de la aparición de la enfermedad injerto contra huésped (GvHD, por sus siglas en inglés), una complicación grave y, en ocasiones, mortal. Además, en todos los casos, las células madre del cáncer persistente a menudo conducen a la recaída de la enfermedad.

60

65

El CAR proporciona un enfoque prometedor para la inmunoterapia celular adoptiva para el cáncer. Se ha evaluado la terapia con células T con CAR para el tratamiento de diversos cánceres, cánceres hematopoyéticos pero además tumores derivados de otros tejidos, en estudios clínicos o preclínicos y se han evaluado CAR para múltiples antígenos objetivo diferentes (Anurathapan, U., Leen, A.M., Brenner, M.K., y Vera, J.F. (2014). Engineered T cells for cancer treatment. *Cytotherapy* 16, 713-733.). Entre los cánceres hematológicos, las células T autólogas modificadas con CAR presentan una herramienta prometedora para mejorar el efecto GvL sin la complicación de la GvHD. Como tal, los CAR se han aplicado con mayor éxito para el tratamiento de los cánceres derivados de células B, tales como la ALL y la CLL, mediante el uso de CD19 como antígeno objetivo (Grupp, S.A., Kalos, M., Barrett, D., Aplenc, R., Porter, D.L., Rheingold, S.R., Teachey, D.T., Chew, A., Hauck, B., Wright, J.F., y otros (2013). Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute

lymphoid leukemia. The New England journal of medicine 368, 1509-1518. Porter, D.L., Levine, B.L., Kalos, M., Bagg, A., y June, C.H. (2011). Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. The New England journal of medicine 365, 725-733.). Sin embargo, para diversos otros tipos de cáncer y antígenos objetivo, se han observado los llamados efectos secundarios fuera del tumor/en el objetivo (Morgan, R.A., Yang, J.C., Kitano, M., Dudley, M.E., Laurencot, C.M., y Rosenberg, S.A. (2010). Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. Molecular therapy 18, 843-851.). En estos casos, las células T con CAR se dirigieron específicamente al antígeno deseado, pero la expresión del antígeno objetivo no se restringió al cáncer. En consecuencia, los tejidos sanos se dañaron, lo cual en algunos casos condujo a efectos secundarios graves o incluso a la muerte. Por lo tanto, la aplicación de la terapia de células T con CAR a una gama más amplia de cánceres se ha visto disminuida por la falta de antígenos objetivo adecuados.

Las células T específicas de antígeno pueden usarse en combinación con la HSCT. En ensayos clínicos múltiples, los pacientes con leucemias linfoides se trataron con células T con CAR específicas para CD19 para lograr una remisión temporal y ganar tiempo hasta la identificación de un donante adecuado para la HSCT (Brentjens, R.J., Davila, M.L., Riviere, I., Park, J., Wang, X., Cowell, L.G., Bartido, S., Stefanski, J., Taylor, C., Olszewska, M., y otros (2013). CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. Science translational medicine 5, 177ra138.). Se ha propuesto un enfoque similar para un CAR dirigido a CD123, un antígeno que se expresa en las leucemias mieloides, pero que además está presente en el compartimiento de células mieloides sanas (Gill, S., Tasian, S.K., Ruella, M., Shestova, O., Li, Y., Porter, D.L., Carroll, M., Danet-Desnoyers, G., Scholler, J., Grupp, S.A., y otros (2014). Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells. Blood 123, 2343-2354.). La eficiencia de agotamiento mieloides se ha demostrado para un CAR CD123 en un modelo preclínico que sugiere que las células T con CAR CD123 podrían usarse como parte de un régimen de precondicionamiento antes de la HSCT. Sin embargo, para evitar la toxicidad fuera del tumor/en el objetivo, las células T con CAR tienen que estar ausentes completamente en el momento de la HSCT así como también después de esta. Para el enfoque CAR CD19, la aplicación de las células T con CAR y la HSCT podrían separarse por un mes y se ha demostrado que algunas células T con CAR CD19 tienen un tiempo de vida limitado (Brentjens, R.J., Davila, M.L., Riviere, I., Park, J., Wang, X., Cowell, L.G., Bartido, S., Stefanski, J., Taylor, C., Olszewska, M., y otros (2013). CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. Science translational medicine 5, 177ra138.). Para el CAR CD123, sin embargo, el tratamiento con células T con CAR tiene que seguirse por una HSCT dentro de pocos días para evitar una mielocitopenia potencial y el rápido agotamiento de las células T con CAR presenta un desafío significativo.

Para las células T modificadas por ingeniería genética que expresan un CAR o un TCR transgénico, los efectos secundarios fuera del tumor/en el objetivo pueden incluir, además, el llamado fratricidio de células T, si el antígeno objetivo se expresa por las propias células T. El fratricidio de células T con CAR CD38 observado durante el cultivo *in vitro* podría prevenirse mediante el uso de un anticuerpo anti-CD38 que bloquea la interacción objetivo-CAR. Sin embargo, tal enfoque, hasta la fecha, no se ha probado *in vivo*. El bloqueo mediado por anticuerpos del fratricidio *in vivo* solo se ha demostrado para las células NK en un modelo murino mediante el uso de un anticuerpo monoclonal contra CD244 (Taniguchi, R.T., Guzior, D., y Kumar, V. (2007). 2B4 inhibits NK-cell fratricide. Blood 110, 2020-2023.).

En un estudio de seguridad clínica mediante el uso de un CAR CAIX para el tratamiento del carcinoma de células renales, se informó toxicidad fuera del tumor/en el objetivo debido a la expresión baja del antígeno objetivo en el hígado (Lamers, C.H., Sleijfer, S., van Steenberghe, S., van Elzakker, P., van Krimpen, B., Groot, C., Vulto, A., den Bakker, M., Oosterwijk, E., Debets, R., y otros (2013). Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity. Molecular therapy 21, 904-912.). La toxicidad fuera del tumor/en el objetivo podría prevenirse mediante el tratamiento con un anticuerpo monoclonal CAIX, el cual bloquea la interacción objetivo-CAR. Sin embargo, con el tratamiento con anticuerpos la respuesta antitumoral fue indetectable igualmente.

Para las células T que expresan un TCR transgénico, el fratricidio puede evitarse potencialmente, si se usa un donante de células T alogénico negativo para el tipo HLA dirigido (Leisegang, M., Wilde, S., Spranger, S., Milosevic, S., Frankenberger, B., Uckert, W., y Schendel, D.J. (2010). MHC-restricted fratricide of human lymphocytes expressing survivin-specific transgenic T cell receptors. The Journal of clinical investigation 120, 3869-3877. Schendel, D.J., y Frankenberger, B. (2013). Limitations for TCR gene therapy by MHC-restricted fratricide and TCR-mediated hematopoietic stem cell toxicity. Oncoimmunology 2, e22410.).

La modificación genética de las moléculas de HLA para crear células que ya no son el objetivo de TCR transgénicos o de origen natural se describe en el documento WO2012012667A2. Las nucleasas de diseño tales como ZFN o TALEN se aplican para la delección de una o más moléculas de HLA.

Se ha descrito la modificación mediada por nucleasas de diseño de células hematopoyéticas, lo que incluye células T y células madre hematopoyéticas (HSC) para la generación de células T resistentes al VIH (Holt, N., Wang, J., Kim, K., Friedman, G., Wang, X., Taupin, V., Crooks, G.M., Kohn, D.B., Gregory, P.D., Holmes, M.C., y otros (2010). Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 *in vivo*. Nature biotechnology 28, 839-847.) (documento núm. US20120309091A1). CCR5, un coreceptor requerido para la entrada del VIH en las células T, se elimina mediante el uso de una ZFN. Se ha demostrado que las células T con CCR5 eliminado son insensibles a la infección por VIH.

El desarrollo de nucleasas de diseño (ZFN, TALEN y CRISPR/Cas), así como también represores transcripcionales (dedos de zinc, proteínas de fusión a base de TALEN o CRISPR/Cas) para la delección o la represión transcripcional de las proteínas de superficie hematopoyéticas CTLA-4 y PD-1, en combinación con opcionalmente CAR o TCR transgénicos, se ha descrito en el documento WO2014059173A2.

Nakamura De Oliveira y otros (2013, Human Gene Therapy, vol. 24:824-839) como la técnica anterior más relevante, que describe la modificación de la HSPC con CAR como una estrategia para generar linajes múltiples de células efectoras para la inmunoterapia contra malignidades de linaje B para aumentar la actividad injerto contra leucemia. No dice nada sobre el uso de células hematopoyéticas modificadas para el uso en inmunoterapia para reducir los efectos secundarios contra las células no objetivo que expresan antígenos, sino que trata sobre amplificar el efecto antileucémico, lo cual más bien aumenta los efectos secundarios en vez de disminuirlos.

Morgan y otros (2012, Human Gene Therapy, vol. 23:1043-1053) describen la actividad antitumoral de células T modificadas por ingeniería genética con CAR para reconocer el EGFRvIII, una proteína EGFR mutante, la cual se expresa solo en células cancerosas (células madre de glioma y líneas celulares de glioma) pero no en el tejido cerebral normal, por lo tanto, puede considerar al EGFRvIII como un marcador tumoral clásico específico. Además, esta variante se asocia con la tumorigenicidad, ya que alberga una eliminación en marco de los exones 2-7 lo cual vuelve a la proteína activa constitutivamente en un modo independiente del ligando.

Hinrichs y otros (2013, Nature Biotechnology, vol. 31:999-1008) describen el uso de receptores de reconocimiento de antígeno expresados en la superficie de las células T en inmunoterapia para mejorar la seguridad, en donde dicho receptor de reconocimiento de antígeno reconoce productos génicos mutados (antígenos mutados) en células malignas. Un ejemplo de dicho producto génico mutado es el EGFRvIII.

Uchiyama y otros (2010, Cancer Science, vol. 101:201 -209) describen los porcentajes de relaciones de unión de diferentes anticuerpos monoclonales anti-CD20 para el CD20 mutante (A170S, P172) en comparación con el CD20 de tipo salvaje.

En conjunto, en los últimos años ha habido un progreso sólido en el desarrollo de inmunoterapias dirigidas contra múltiples enfermedades, lo que incluye algunos tipos de cáncer. Sin embargo, la falta de moléculas objetivo adecuadas para terapias con receptores de reconocimiento de antígenos y, en particular, las células T con CAR ha sido un obstáculo importante. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar terapias novedosas para el tratamiento de enfermedades, tales como el cáncer, que permitan el uso de moléculas objetivo alternativas, y reduzcan o eviten los efectos secundarios asociados a menudo con las inmunoterapias dirigidas actuales en general, y las terapias de células T con CAR en particular.

#### Resumen de la invención

Sorprendentemente, se encontró que los efectos secundarios de un receptor de reconocimiento de antígeno, el cual reconoce un antígeno presente en las células objetivo, pero también en al menos un tipo de célula hematopoyética, pueden reducirse mediante la aplicación de células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento por dicho receptor de reconocimiento de antígeno en una inmunoterapia combinada. Por lo tanto, esta invención se refiere a una combinación de composiciones para su uso en inmunoterapia para reducir los efectos secundarios en un individuo que padece una enfermedad, lo que incluye pero no se limita a cáncer, que comprende I) un receptor de reconocimiento de antígeno expresado en la membrana celular de células efectoras inmunitarias, el cual reconoce un antígeno presente en las células objetivo, pero también en al menos un tipo de célula hematopoyética de dicho individuo, y II) células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento de dicho antígeno por dicho receptor de reconocimiento de antígeno, en donde dichas células hematopoyéticas tienen una desviación en dicho antígeno, y en donde dicho antígeno tiene dicha desviación

i) tiene al menos una variante de corte y empalme dentro del dominio extracelular de dicho antígeno adecuada para generar epítomos diferentes para dominios de unión a antígeno, o

ii) tiene al menos una forma polimórfica natural dentro del dominio extracelular de dicho antígeno adecuada para generar epítomos diferentes para dominios de unión a antígeno; o

iii) se modifica a una forma polimórfica no natural dentro del dominio extracelular de dicho antígeno adecuada para generar epítomos diferentes para dominios de unión a antígeno, en donde dicha forma polimórfica no natural no altera ni afecta la función natural de dicho antígeno en las células; o

iv) se elimina sin alterar o afectar la función natural de la célula hematopoyética.

Como un efecto de la presente invención, puede observarse una reducción de los efectos secundarios de los receptores de reconocimiento de antígeno mediante la aplicación de células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento por dicho receptor de reconocimiento de antígeno en una terapia combinada. Además, la presente descripción se refiere a un método o combinación de composiciones que permite el uso de un grupo de antígenos como objetivos potenciales para la inmunoterapia, que están presentes en al menos un tipo de célula hematopoyética y, por lo tanto, no son objetivos adecuados para las inmunoterapias conocidas actualmente en la técnica. En una modalidad, dichas células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento por dicho receptor de reconocimiento de antígeno expresan una versión de origen natural de dicho antígeno. En otra modalidad, dichas células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento por dicho receptor de reconocimiento de antígeno se modifican genéticamente para expresar una versión alterada de dicho antígeno.

## Breve descripción de los dibujos

- Figura 1: Representación esquemática de una modalidad preferida de la presente descripción, que detalla la aplicación de células efectoras inmunitarias que expresan un receptor de reconocimiento de antígeno y células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento de dicho antígeno por dicho receptor de reconocimiento de antígeno a un individuo.
- Figura 2: Expresión de CD20 WT humano (sec. con núm. de ident.: 3) y CD20 mutante A170S/P172S. Las células HEK 293T se transfectaron de forma simulada o se transfectaron mediante el uso del plásmido pMACS LNGFR-IRES (Miltenyi Biotec GmbH) que codifica un CD20 de tipo salvaje (anotado CD20 WT) o un CD20 mutado (CD20 A170S/P172S). Dos días después de la transfección, se analizaron las células HEK 2913T mediante citometría de flujo para detectar el antígeno CD20 mediante el uso de diferentes anticuerpos anti-CD20 (tinción de epítomos extracelulares de CD20 con el clon LT20 y el clon 2H7 y tinción intracelular de epítomo C-terminal de CD20 con el clon 1412).
- Figura 3: Expresión de citocinas de células T humanas modificadas para expresar un receptor de reconocimiento de antígeno dirigido contra el antígeno CD20 (anotado T-CAR) o células T humanas no modificadas por ingeniería genética para expresar un receptor de reconocimiento de antígeno (denotado T-Simulado) cocultivado con células T HEK 293 que codifican CD20 de tipo salvaje (denotado 293T-CD20) o un CD20 A170S/P172S mutado (anotado 293T-CD20Mut) o ningún antígeno (denotado 293T-Simulado). Se representan los resultados para la expresión de GM-CSF (gráficos de la izquierda) o IL-2 (gráficos de la derecha) para células T derivadas de 2 donantes de sangre. Las citocinas se midieron a partir del sobrenadante después de 24 horas de cocultivo mediante el uso del kit de citocinas MACSPlex de Miltenyi Biotec. El eje X representa las diferentes condiciones. A y B indican los duplicados experimentales.
- Figura 4: Edición de genes del antígeno CD20 mediante el uso de nucleasas de diseño para anular el reconocimiento del antígeno por el anticuerpo anti-CD20 de reconocimiento de antígeno. La línea celular de linfoma de células B Raji, que expresa naturalmente CD20, se transfectó mediante coelectroporación con 3 plásmidos; uno que codifica la proteína fluorescente verde (como control de transfección), uno que codifica las secuencias de ARN guía (ARNg 1-3) (ver sec. con núm. de ident.: 4 y sec. con núm. de ident.: 5, sec. con núm. de ident.: 6 y sec. con núm. de ident.: 7, sec. con núm. de ident.: 8 y sec. con núm. de ident.: 9, respectivamente) y uno que codifica la nucleasa Cas9. 5 días después de la edición del gen, la expresión de CD20 de las células Raji positivas para GFP se analizó por citometría de flujo mediante el uso del anticuerpo anti-CD20 usado para generar el CAR. Los 2 gráficos de puntos a la derecha representan los controles como se indicó.
- Figura 5: Tabla del manuscrito de Zebedee, S.L.; Barritt, D.S.; y Raschke, W.C. (1991. Comparison of Mouse Ly5a and Ly5b Leucocyte Common Antigen Alleles. *Developmental Immunology*, 1, 243-254) que muestra la comparación del cambio de secuencia entre Ly5a y Ly5b, las cuales son isoformas CD45.1 y CD45.2 de ratón. Gracias a la existencia de 2 anticuerpos separados (anti-CD45.2 y anti-CD45.1), ambas isoformas pueden detectarse y discriminarse.
- Figura 6: Análisis de citometría de flujo de células T HEK 293 transfectadas con el plásmido pMACS que codifica WT Ptpcrb (=CD45.2) o 3 versiones mutantes diferentes (con las mutaciones indicadas). Se usa un anticuerpo anti-CD45 (que reconoce ambas isoformas CD45.2 y CD45.1) para confirmar la expresión del antígeno. La secuencia WT es positiva para CD45.2 y negativa para CD45.1. Solo la mutación del aminoácido K en la posición 277 a E permite que el anticuerpo anti-CD45.1 se una al antígeno y anule la unión del anticuerpo anti-CD45.2. Las otras mutaciones mantienen la especificidad para el anticuerpo anti-CD45.2.
- Figura 7: Edición de genes del antígeno CD45.2 mediante el uso de nucleasas de diseño para anular el reconocimiento del antígeno por el anticuerpo de reconocimiento de antígeno anti-CD45.2. La línea celular 1881 que expresa naturalmente CD45.2 se transfectó por coelectroporación con 3 plásmidos; uno que codifica la proteína verde fluorescente (como control de transfección), uno que codifica las secuencias de ARN guía (ARNg 1 y 2 o para el control ARNg1 de CD20) (ver sec. con núm. de ident.: 10 y sec. con núm. de ident.: 11, o sec. con núm. de ident.: 12 y sec. con núm. de ident.: 13) y uno que codifica la nucleasa Cas9. 4 días después de la edición del gen, se analizó la expresión de CD45.1 de las células 1881 positivas para GFP por citometría de flujo mediante el uso del anticuerpo anti-CD45.2. Los 2 gráficos de puntos a la derecha representan los controles como se indica para una muestra no incubada con el anticuerpo anti-CD45.2.
- Figura 8: representa la Tabla 1 del manuscrito de Holmes (*Immunology* (2006), vol. 117: 145-155) que detalla las isoformas (funcionales) conocidas de CD45 humano.

## Descripción detallada de la invención

En terapias dirigidas, lo que incluye aquellas que usan receptores de reconocimiento de antígenos, los efectos secundarios que resultan de la presencia del antígeno objetivo en células no objetivo representan un obstáculo importante para el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer. Dichos efectos secundarios a menudo incluyen y, a veces, se restringen a células hematopoyéticas, lo cual conduce al agotamiento de una o más subpoblaciones hematopoyéticas. La invención se basa en el hecho de que subconjuntos pequeños de células hematopoyéticas o todo el sistema hematopoyético pueden reemplazarse mediante trasplante. Si las células hematopoyéticas aplicadas son resistentes al reconocimiento de dicho receptor de reconocimiento de antígeno, ellas pueden usarse para reemplazar dichas células hematopoyéticas agotadas y representan una forma para el tratamiento de los efectos secundarios de un receptor de reconocimiento de antígeno. Ilustrativamente, el concepto de la presente invención se muestra mediante el uso de los antígenos CD20 y CD45 y antígenos seleccionados de estos. Pero se explica por sí mismo que el concepto de la presente invención no se restringe a estos antígenos, las variantes seleccionadas de estos y las células usadas en la presente descripción.

En un aspecto, la invención proporciona una combinación de composiciones para su uso en la inmunoterapia para reducir los efectos secundarios de un receptor de reconocimiento de antígeno expresado en la membrana celular de células efectoras inmunitarias contra células no objetivo que expresan antígeno en un individuo, que comprende

- 5 a) Dicho receptor de reconocimiento de antígeno expresado en la membrana celular de células efectoras inmunitarias en donde dicho receptor de reconocimiento de antígeno reconoce específicamente un antígeno en células objetivo en dicho individuo;
- b) Células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento de dicho antígeno por dicho receptor de reconocimiento de antígeno, en donde dichas células hematopoyéticas tienen una desviación en dicho antígeno, y en donde dicho antígeno tiene dicha desviación
- 10 i) tiene al menos una variante de corte y empalme dentro del dominio extracelular de dicho antígeno adecuada para generar epítomos diferentes para dominios de unión a antígeno, o
- ii) tiene al menos una forma polimórfica natural dentro del dominio extracelular de dicho antígeno adecuada para generar epítomos diferentes para dominios de unión a antígeno; o
- 15 iii) se modifica a una forma polimórfica no natural dentro del dominio extracelular de dicho antígeno adecuada para generar epítomos diferentes para dominios de unión a antígeno, en donde dicha forma polimórfica no natural no altera ni afecta la función natural de dicho antígeno en las células; o
- iv) se elimina sin alterar o afectar la función natural de la célula hematopoyética, en donde dicho antígeno se expresa en células objetivo en dicho individuo y al menos en un tipo de célula hematopoyética de dicho individuo.

20 Además, la presente descripción proporciona el uso de una combinación de composiciones para su uso en la inmunoterapia para reducir los efectos secundarios de un receptor de reconocimiento de antígeno contra células no objetivo que expresan antígeno en un individuo, el sistema comprende

- 25 a) Dicho receptor de reconocimiento de antígeno en donde dicho receptor de reconocimiento de antígeno reconoce específicamente un antígeno en células objetivo en dicho individuo;
- b) Células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento de dicho antígeno por dicho receptor de reconocimiento de antígeno; en donde dicho antígeno se expresa en células objetivo en dicho individuo y al menos en un tipo de célula hematopoyética de dicho individuo.

30 Además, la presente descripción proporciona un método para reducir los efectos secundarios en una inmunoterapia de un receptor de reconocimiento de antígeno contra células no objetivo que expresan antígeno en un individuo, que comprende

- 35 a) Aplicación del receptor de reconocimiento de antígeno a dicho individuo, en donde dicho receptor de reconocimiento de antígeno reconoce específicamente un antígeno en células objetivo en dicho individuo;
- b) Aplicación de células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento de dicho antígeno por dicho receptor de reconocimiento de antígeno; en donde dicho antígeno se expresa en células objetivo en dicho individuo y al menos en un tipo de célula hematopoyética de dicho individuo.

40 Además, la presente descripción proporciona un método para producir una combinación de composiciones para su uso en la inmunoterapia para reducir los efectos secundarios de un receptor de reconocimiento de antígenos contra células no objetivo que expresan antígenos en un individuo, en donde dicha combinación de composiciones comprende dos composiciones, el método comprende

- 45 a) generar un receptor de reconocimiento de antígeno en donde dicho receptor de reconocimiento de antígeno reconoce específicamente un antígeno en células objetivo en dicho individuo, lo que genera de esta manera la primera composición de dicha combinación de composiciones; y
- b) generar células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento de dicho antígeno por dicho receptor de reconocimiento de antígeno, lo que genera de esta manera la segunda composición de dicha combinación de composiciones;
- 50 en donde dicho antígeno se expresa en células objetivo en dicho individuo y al menos en un tipo de célula hematopoyética de dicho individuo.

55 El receptor de reconocimiento de antígeno puede ser un receptor soluble o puede expresarse en la membrana celular de una célula efectora inmunitaria. Los receptores anclados a la membrana celular incluyen, pero no se restringen a, receptores naturales tales como los receptores de células T (TCR) o los receptores modificados por ingeniería genética, tales como los TCR transgénicos o los receptores de antígenos quiméricos (CAR). Las células efectoras inmunitarias incluyen, pero no se restringen a, células con función efectora citotóxica, tales como células asesinas naturales (NK) o células T. Las células efectoras inmunitarias pueden comprender uno o más subconjuntos celulares. En una variante preferida de la invención, la célula efectora inmune es una célula T modificada por ingeniería genética para expresar un CAR.

Dichas células hematopoyéticas pueden ser células madre hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas.

- 65 Dichas células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento de dicho antígeno por dicho receptor de reconocimiento de antígeno pueden tener una desviación en dicho antígeno, lo que altera de esta manera el epítomo reconocido por dicho

receptor de reconocimiento de antígeno, lo resulta en un reconocimiento nulo o un reconocimiento mitigado por dicho receptor de reconocimiento de antígeno.

5 Dichas células efectoras inmunitarias que expresan dicho receptor de reconocimiento de antígeno pueden ser dichas células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento de dicho antígeno por dicho receptor de reconocimiento de antígeno, lo que evita de esta manera el fratricidio.

Dichas células efectoras inmunitarias que expresan dicho receptor de reconocimiento de antígeno pueden ser trasplantes autólogos o alogénicos.

10 Dichas células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento de dicho antígeno por dicho receptor de reconocimiento de antígeno pueden ser trasplantes autólogos o alogénicos.

15 Dicho antígeno puede seleccionarse de, pero no se restringe al grupo que consiste de CD11a, CD18, CD19, CD20, CD31, CD34, CD44, CD45, CD47, CD51, CD58, CD59, CD63, CD97, CD99, CD100, CD102, CD123, CD127, CD133, CD135, CD157, CD172b, CD217, CD300a, CD305, CD317 y CD321.

20 Dicho receptor de reconocimiento de antígeno puede comprender un dominio de unión a antígeno que reconoce específicamente el antígeno CD20, y en donde dichas células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento de dicho antígeno por dicho receptor de reconocimiento de antígeno pueden tener una desviación en dicho antígeno, lo que altera de esta manera el epítipo reconocido por dicho receptor de reconocimiento de antígeno.

25 Dicho receptor de reconocimiento de antígeno puede ser un CAR, y en donde dicho dominio de unión a antígeno de dicho CAR puede comprender las secuencias de aminoácidos sec. con núm. de ident.: 1 (V<sub>H</sub>) y sec. con núm. de ident.: 2 (V<sub>L</sub>). Dicha desviación en dicho antígeno CD20 de dichas células hematopoyéticas puede ser la sustitución de aminoácido alanina a serina en la posición 170 y/o prolina a serina en la posición 172 de dicho antígeno CD20. La secuencia de aminoácidos de CD20 se proporciona en la sec. con núm. de ident.: 3.

30 El CAR puede comprender, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, la parte extracelular que comprende al menos un dominio de unión a antígeno, el dominio transmembrana y el al menos un dominio de señalización intracelular. Pero el CAR puede comprender, además, dos o más miembros de polipéptidos que trabajan conjuntamente como CAR activo funcional (por ejemplo, CAR de encendido, CAR activo condicionalmente, CAR regulable, CAR controlable, CAR de cadena múltiple), por ejemplo, un primer polipéptido que comprende al menos un dominio de unión a antígeno, un primer miembro de un par de dimerización y un dominio transmembrana; y un segundo polipéptido que comprende un segundo miembro de un par de dimerización, y al menos un dominio de señalización intracelular (para la señalización clave del CAR activo), y opcionalmente un dominio transmembrana, en donde el CAR se activa tras la dimerización mediante un dimerizador que reconoce los miembros de la pareja de dimerización. Dichos constructos de CAR con módulos de señalización clave y de reconocimiento divididos se describen, por ejemplo, en los documentos WO2014/127261A1, WO2015017214A1, WO2015090229A1, WO2015142661A1, y WO2015150771A1.

40 Las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética, preferentemente las células T pueden expresar un CAR como se describe en la presente descripción, que es capaz de redirigir el reconocimiento del antígeno en base a la especificidad de unión al antígeno del CAR.

45 El receptor de reconocimiento de antígeno como se describe en la presente descripción tal como un CAR reconoce y se une al antígeno a través de un determinado epítipo que constituye solo una fracción pequeña del antígeno tal como una secuencia peptídica de una proteína. A su vez, las desviaciones en el epítipo resultan en la alteración de la afinidad de unión del receptor de reconocimiento de antígeno a su antígeno y pueden conducir a la pérdida completa de la unión específica. La presente descripción explota el efecto de que las células hematopoyéticas que expresan un antígeno objetivo con dicho epítipo alterado son resistentes al reconocimiento y unión del receptor de reconocimiento de antígeno como se describe en la presente descripción. Dichas células hematopoyéticas pueden derivarse de un individuo portador de un polimorfismo de origen natural que conduce al epítipo alterado o el epítipo alterado puede generarse a través de la modificación genética de dichas células hematopoyéticas.

Modalidades

55 En una modalidad de la presente descripción, el receptor de reconocimiento de antígeno en el presente método o sistema para reducir los efectos secundarios de un receptor de reconocimiento de antígeno contra células no objetivo que expresan antígeno es un CAR, el cual se expresa en una célula efectora inmunitaria, preferentemente en una célula T. Los métodos para la purificación y la generación de células efectoras inmunitarias modificadas por ingeniería genética para expresar un CAR se conocen bien en la técnica. Las células efectoras inmunitarias, preferentemente las células T, pueden obtenerse de una variedad de fuentes, lo que incluye, pero no se restringe a, células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés), leucaféresis o muestras de médula ósea. Para el enriquecimiento de estas células pueden usarse métodos que se conocen bien en la técnica, como la centrifugación a través de un gradiente de Ficoll™ o PERCOLL™, o técnicas de selección positiva/negativa, tales como la clasificación por fluorescencia (por ejemplo, FACS) o la clasificación magnética (por ejemplo, MACS®). En una modalidad, las células T obtenidas de un individuo se marcan magnéticamente, por ejemplo con una perla magnética acoplada a anticuerpos específicos para CD4 y para CD8,

respectivamente, enriquecidos magnéticamente y colectados. En una modalidad, las células T modificadas por ingeniería genética para expresar un CAR pueden activarse y expandirse antes o después de la ingeniería genética para aumentar la cantidad de células T modificadas por ingeniería genética, mediante el uso generalmente de métodos que se conocen bien en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de estimulación policlonal con perlas de anti-CD3/anti-CD28 o nanomatrices anti-CD3/anti-CD28 (documento EP2711418A1). Preferentemente, dicha cantidad de células T modificadas por ingeniería genética se incrementa hasta una cantidad eficaz terapéuticamente.

En una modalidad de la presente descripción, se genera una célula efectora inmune, preferentemente una célula T que expresa un CAR, mediante el uso de métodos que se conocen comúnmente en la técnica. En una modalidad preferida, las células T se modifican por ingeniería genética para expresar un CAR mediante el uso de un sistema basado en virus, por ejemplo, un vector lentiviral o un vector  $\gamma$ -retroviral para lograr la expresión del CAR en dichas células T durante varias semanas, meses o hasta varios años.

En una modalidad de la presente descripción, el CAR del presente método o combinación de composiciones puede ser específico para la proteína transmembrana CD20 que se expresa en células enfermas en un individuo, por ejemplo, una célula cancerosa tal como una célula de melanoma positiva para CD20 o una célula hematopoyética maligna positiva para CD20, por ejemplo, una célula de linfoma o una célula de leucemia linfocítica crónica o una célula de leucemia linfocítica aguda.

En una modalidad de la presente descripción, las células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento de dicho antígeno por dicho CAR del presente método o combinación de composiciones pueden ser células madre hematopoyéticas. Estas células se alteran con respecto a dicho antígeno, por ejemplo, CD20, de modo que dicho CAR no reconoce el antígeno alterado. La desviación de dicho antígeno puede ser un polimorfismo natural de dicho antígeno. En una modalidad de la presente descripción, dicho antígeno en dichas células hematopoyéticas, por ejemplo, células madre hematopoyéticas, se altera mediante modificación genética del ADN genómico de dicha célula hematopoyética. La modificación genética puede implicar la alteración de la secuencia de ADN genómico que codifica dicho antígeno reconocido por dicho CAR.

La modificación genética del ADN genómico de células tales como las células hematopoyéticas, por ejemplo, las células madre hematopoyéticas, puede realizarse mediante métodos que se conocen bien en la técnica. La modificación genética puede realizarse mediante la introducción de nucleasas de diseño tales como ZFN, TALEN o CRISPR/Cas en células hematopoyéticas. Pueden usarse nucleasas de diseño para introducir roturas de cadena en ubicaciones específicas del ADN genómico de una célula, lo cual puede inducir mecanismos de reparación propensos a errores, tales como la unión de extremos no homólogos en la célula que conduce a inserciones o deleciones en dicha ubicación del ADN genómico. Dicha ubicación puede ser parte de la secuencia genómica que codifica dicho antígeno y conduce a la ausencia de dicho antígeno en dichas células. En una modalidad de la presente descripción, una nucleasa de diseño específica para dicho antígeno, por ejemplo, CD20, se aplica a células hematopoyéticas tales como células madre hematopoyéticas para generar una célula que carece de la expresión de CD20. La nucleasa de diseño puede aplicarse junto con un ADN molde para explotar el mecanismo de reparación celular de recombinación homóloga, que conduce a la inclusión de la secuencia genómica del ADN molde en el sitio de la rotura de la cadena introducida por la nucleasa de diseño. En una modalidad de la presente descripción, una nucleasa de diseño específica para la secuencia genómica de CD20 se aplica a células hematopoyéticas tales como células madre hematopoyéticas, conjuntamente con un ADN molde que es en gran parte homólogo a la secuencia genómica de CD20 pero que contiene una o más alteraciones de secuencia.

Tanto las células efectoras inmunitarias modificadas por ingeniería genética para expresar dicho CAR como las células hematopoyéticas con dicho antígeno alterado se aplican a un individuo que padece una enfermedad asociada con dicho antígeno. En una modalidad preferida de la presente descripción, las células T modificadas por ingeniería genética para expresar un CAR específico para CD20, y las células madre hematopoyéticas que expresan una versión alterada de CD20 no reconocida por el CAR, se aplican a un individuo que padece una enfermedad asociada con CD20. En una modalidad de la presente descripción, dicha enfermedad es un cáncer que incluye, pero no se restringe a, melanoma, linfoma, leucemia linfocítica crónica o leucemia linfocítica aguda. En una modalidad de la presente descripción, el individuo puede presentar depleción de las células hematopoyéticas, lo que incluye las células madre hematopoyéticas, mediante un procedimiento que se conoce comúnmente en la técnica, tal como quimioterapia o radioterapia. En una modalidad de la presente descripción, la aplicación de células T modificadas por ingeniería genética para expresar un CAR y células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento de dicho antígeno por dicho CAR se combina con tratamientos adicionales. Dichos tratamientos pueden incluir, pero no se restringen a, la aplicación de citocinas o inhibidores de la señalización de citocinas, tales como etanercept y tocilizumab.

En una modalidad preferida de la presente descripción, las células efectoras inmunitarias modificadas por ingeniería genética para expresar dicho CAR, así como también las células hematopoyéticas con dicho antígeno alterado se derivan de dicho individuo que padece una enfermedad asociada con dicho antígeno antes del tratamiento. Dicho procedimiento se conoce en la técnica como una terapia celular autóloga. En otra modalidad de la presente descripción, las células efectoras inmunitarias modificadas por ingeniería genética para expresar dicho CAR, así como también las células hematopoyéticas con dicho antígeno alterado se derivan de un individuo sano y se aplican a otro individuo que padece una enfermedad asociada con dicho antígeno. Dicho procedimiento se conoce en la técnica como una terapia celular alogénica. La ejecución de la presente descripción en una configuración alogénica puede permitir el direccionamiento de un antígeno con un polimorfismo de origen natural. En una modalidad de la presente descripción, las células

hematopoyéticas, tales como las células madre hematopoyéticas, se derivan de un individuo con un polimorfismo de origen natural en el antígeno asociado con la enfermedad. En otra modalidad de la presente descripción, las células hematopoyéticas, tales como las células madre hematopoyéticas, así como también las células efectoras inmunitarias, tales como las células T, se derivan de un individuo con un polimorfismo de origen natural en el antígeno asociado con la enfermedad. En una modalidad de la presente descripción, el TCR natural se depleta de dichas células T alogénicas mediante el uso de métodos que se conocen comúnmente en la técnica. En una modalidad de la presente descripción, las células efectoras inmunitarias alogénicas pueden combinarse con células hematopoyéticas autólogas o las células efectoras inmunitarias autólogas pueden combinarse con células hematopoyéticas alogénicas.

El antígeno asociado con la enfermedad puede presentarse en las células enfermas y de cualquier otra manera restringido a las células efectoras inmunitarias modificadas por ingeniería genética, tales como las células T que expresan un receptor de reconocimiento de antígeno, tal como un CAR. En ese caso, los efectos secundarios del receptor de reconocimiento de antígeno se restringirán a las células efectoras inmunitarias modificadas por ingeniería genética para expresar el receptor de reconocimiento de antígeno. Dicho efecto secundario se conoce también en la técnica como fratricidio. Por lo tanto, en una modalidad de la presente descripción, las células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento de dicho antígeno por dichos receptores de reconocimiento de antígeno son dichas células efectoras inmunitarias. Dichas células efectoras inmunitarias pueden modificarse por ingeniería genética para expresar un receptor de reconocimiento de antígeno, además de modificarse genéticamente para expresar una versión alterada de dicho antígeno. En otra modalidad de la presente descripción, dichas células efectoras inmunitarias pueden ser resistentes al fratricidio debido a la expresión de una versión polimórfica de origen natural de dicho antígeno.

Los péptidos derivados de las proteínas asociadas a la membrana, intra así como también extracelulares, se presentan en la superficie de las células en un complejo con moléculas de HLA y pueden detectarse específicamente por los TCR. Además, pueden detectarse complejos específicos de HLA-antígeno mediante TCR transgénicos. En una modalidad, la presente descripción proporciona un método para reducir los efectos secundarios de una célula efectora inmunitaria, tal como una célula T modificada por ingeniería genética para expresar un TCR transgénico, mediante la aplicación de células hematopoyéticas que presentan un complejo HLA-antígeno, que no puede reconocerse por dicho TCR transgénico. En una modalidad de la presente descripción, dicho complejo HLA-antígeno se forma por dicha molécula de HLA con un péptido que comprende una secuencia alterada, o dicho complejo HLA-antígeno no se forma, por ejemplo, debido a una secuencia peptídica alterada. La alteración de la secuencia peptídica puede ser un polimorfismo natural de dicho péptido o puede generarse mediante modificación genética. Los polimorfismos naturales de los péptidos presentados en las moléculas de HLA se conocen también en la técnica como antígenos menores.

El antígeno usado en el presente método o combinación de composiciones debe expresarse en células objetivo en el individuo enfermo y al menos en un tipo de célula hematopoyética. Preferentemente, dicho antígeno es un antígeno de la superficie celular seleccionado de, pero no restringido al grupo que consiste de CD11a, CD18, CD19, CD20, CD31, CD34, CD44, CD45, CD47, CD51, CD58, CD59, CD63, CD97, CD99, CD100, CD102, CD123, CD127, CD133, CD135, CD157, CD172b, CD217, CD300a, CD305, CD317 y CD321. Con mayor preferencia, dicho antígeno es CD20. En una modalidad de la presente descripción, dicho antígeno tiene al menos una variante de corte y empalme dentro del dominio extracelular de dicho antígeno adecuada para generar epítomos diferentes para dominios de unión a antígeno. En otra modalidad de la presente descripción, dicho antígeno tiene al menos una forma polimórfica natural dentro del dominio extracelular de dicho antígeno adecuada para generar epítomos diferentes para dominios de unión a antígeno. En otra modalidad de la presente descripción, dicho antígeno puede modificarse a una forma polimórfica no natural dentro del dominio extracelular de dicho antígeno adecuada para generar epítomos diferentes para dominios de unión a antígeno, en donde dicha forma polimórfica no natural no altera ni afecta la función natural de las células hematopoyéticas en un individuo. En otra modalidad de la presente descripción, dicho antígeno puede eliminarse sin alterar o afectar la función natural de las células hematopoyéticas en dicho individuo.

El receptor de reconocimiento de antígeno de la presente descripción (ya sea en forma soluble o como parte de una célula inmunitaria) puede administrarse solo o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes tales como IL-2 u otras citocinas o poblaciones celulares. En resumen, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden comprender el receptor de reconocimiento de antígeno de la presente descripción como se describe en la presente descripción, en combinación con uno o más portadores, diluyentes o excipientes aceptables farmacéutica o fisiológicamente. Dichas composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes.

Preferentemente, las composiciones de la presente descripción se formulan para la administración intravenosa. La administración de composiciones celulares al sujeto puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente conocida en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden administrarse de una manera apropiada para la enfermedad tratada. Las dosis apropiadas pueden determinarse mediante ensayos clínicos. Además, la cantidad y la frecuencia de la administración se determinarán e influenciarán por factores como la condición del paciente y el tipo y la gravedad de la enfermedad del paciente. Una composición farmacéutica que comprende células inmunitarias como se

describe en la presente descripción puede administrarse en una dosis de  $10^2$  a  $10^9$  células/kg de peso corporal, preferentemente  $10^3$  a  $10^6$  células/kg de peso corporal. Además, las composiciones celulares pueden administrarse múltiples veces a estas dosis. Las composiciones de células pueden inyectarse directamente en un tumor, ganglio linfático o sitio de infección.

5 Las células pueden activarse y expandirse a cantidades terapéuticas eficaces mediante el uso de métodos conocidos en la técnica.

10 Las células de la presente descripción pueden usarse en combinación con, por ejemplo, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, anticuerpos o terapias de anticuerpos.

15 Las células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento de dicho antígeno por dicho receptor de reconocimiento de antígeno pueden administrarse al mismo tiempo o en un momento antes o después del receptor de reconocimiento de antígeno de la presente descripción o las células efectoras inmunitarias que expresan el receptor de reconocimiento de antígeno de la presente descripción, lo que incluye las células T con CAR. En una modalidad preferida, las células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento de dicho antígeno por dicho receptor de reconocimiento de antígeno se administran antes del tratamiento con células efectoras inmunitarias que expresan el receptor de reconocimiento de antígeno de la presente descripción. De esta manera, se logra la reconstitución parcial o completa del sistema sanguíneo con células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento de dicho antígeno por dicho receptor de reconocimiento de antígeno. Para una reconstitución potenciada, puede usarse un tratamiento de quimioterapia antes de la administración de dichas células hematopoyéticas. En este contexto, durante el tratamiento con las células efectoras inmunitarias, el individuo tratado siempre tendrá un sistema sanguíneo al menos parcialmente funcional, y se evitará la depleción completa del sistema sanguíneo.

25 Definiciones

A menos que se especifique de cualquier otra manera, los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el que se conoce comúnmente por los expertos en la técnica a la cual pertenece esta invención.

30 El término "célula enferma", como se usa en la presente descripción, se refiere al estado de una célula, tejido u organismo que diverge del estado normal o saludable y puede resultar de la influencia de un patógeno, una sustancia tóxica, irradiación o desregulación interna de la célula. Además, "célula enferma" puede referirse a una célula que se ha infectado con un virus patógeno. Además, el término "célula enferma" puede referirse a una célula maligna o célula neoplásica que puede constituir o dar lugar a cáncer en un individuo.

35 El término "cáncer" se conoce médicamente como una neoplasia maligna. El cáncer es un grupo amplio de enfermedades que involucran el crecimiento celular regulado positivamente. En el cáncer, las células (células cancerosas) se dividen y crecen sin control, lo que forma tumores malignos, e invade las partes cercanas del cuerpo. Además, el cáncer puede diseminarse a partes más distantes del cuerpo a través del sistema linfático o del torrente sanguíneo. Existen más de 200 cánceres conocidos diferentes que afectan a los seres humanos.

40 El término "maligna" o "malignidad" describe células, grupos de células o tejidos que constituyen una neoplasia, se derivan de una neoplasia o pueden ser el origen de células neoplásicas nuevas. El término se usa para describir las células neoplásicas en contraste con las células normales o sanas de un tejido. Un tumor maligno contrasta con un tumor benigno no canceroso en que una malignidad no se autolimita en su crecimiento, es capaz de invadir tejidos adyacentes, y puede ser capaz de propagarse a tejidos distantes. Un tumor benigno no tiene ninguna de esas propiedades. La malignidad se caracteriza por anaplasia, invasividad y metástasis, así como también por inestabilidad del genoma. El término "células premalignas" se refiere a las células o tejidos que aún no son malignos, pero se preparan para convertirse en malignos.

45 El término "quimioterapia" se refiere al tratamiento del cáncer (células cancerosas) con uno o más fármacos antineoplásicos citotóxicos ("agentes quimioterapéuticos" o "fármacos quimioterapéuticos") como parte de un régimen estandarizado. La quimioterapia puede administrarse con una intención curativa o puede tener como objetivo prolongar la vida o paliar los síntomas. A menudo se usa junto con otros tratamientos contra el cáncer, tales como radioterapia, cirugía y/o terapia de hipertermia. Los agentes quimioterapéuticos tradicionales actúan mediante la destrucción de las células que se dividen rápidamente, una de las propiedades principales de la mayoría de las células cancerosas. Esto significa que la quimioterapia también daña las células que se dividen rápidamente en circunstancias normales, tales como las células de la médula ósea, el tracto digestivo y los folículos pilosos. Esto produce los efectos secundarios más comunes de la quimioterapia, tales como la mielosupresión (disminución de la producción de células sanguíneas y, por lo tanto, también la inmunosupresión), la mucositis (inflamación del revestimiento del tracto digestivo) y la alopecia (pérdida del cabello).

50 El término "célula inmunitaria" o "célula efectora inmunitaria" se refiere a una célula que puede ser parte del sistema inmunitario y ejecuta una función efectora particular, tal como las células T alfa-beta, las células NK, las células NKT, las células B, las células linfoides innatas (ILC, por sus siglas en inglés), células asesinas inducidas por citocinas (CIK, por sus siglas en inglés), células asesinas activadas por linfocinas (LAK, por sus siglas en inglés), células T gamma-delta,

5 células madre mesenquimáticas o células estromales mesenquimáticas (MSC, por sus siglas en inglés), monocitos o macrófagos. Las células inmunitarias preferidas son células con función efectora citotóxica tales como células T alfa-beta, células NK, células NKT, células ILC, células CIK, células LAK o células T gamma-delta. "Función efectora" significa una función especializada de una celda, por ejemplo, en una célula T, una función efectora puede ser una actividad citolítica o una actividad cooperadora, lo que incluye la secreción de citocinas.

10 El término "efectos secundarios" se refiere a cualquier complicación, resultado no deseado o patológico de una inmunoterapia con un receptor de reconocimiento de antígeno que se produce además del resultado del tratamiento deseado. El término "efecto secundario" se refiere preferentemente a la toxicidad fuera del tumor/en el objetivo, que puede ocurrirse durante la inmunoterapia en caso de presencia del antígeno objetivo en una célula que es una célula no objetivo que expresa antígeno pero no una célula enferma como se describe en la presente descripción. Un efecto secundario de una inmunoterapia puede ser el desarrollo de una enfermedad del injerto frente al huésped.

15 El término "reducir los efectos secundarios" se refiere a la disminución de la gravedad de cualquier complicación, resultado no deseado o patológico de una inmunoterapia con un receptor de reconocimiento de antígeno, tal como la toxicidad hacia una célula no objetivo que expresa el antígeno. Además, "reducir los efectos secundarios" se refiere a medidas que disminuyan o eviten el dolor, el daño o el riesgo de muerte del paciente durante la inmunoterapia con un receptor de reconocimiento de antígeno.

20 El término "inmunoterapia combinada" se refiere a la aplicación concertada de dos enfoques de terapia, por ejemplo, enfoques terapéuticos conocidos en la técnica para el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer. Además, el término "inmunoterapia combinada" puede referirse a la aplicación concertada de una inmunoterapia, tal como el tratamiento con un receptor de reconocimiento de antígeno y otra terapia, tal como el trasplante de células hematopoyéticas, por ejemplo, células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento por el receptor de reconocimiento de antígeno.

La expresión de un antígeno en una célula significa que el antígeno está presente suficientemente en la superficie celular de dicha célula, de modo que puede detectarse, unirse y/o reconocerse por un receptor de reconocimiento de antígeno.

30 El término "células hematopoyéticas", se refiere a una población de células del linaje hematopoyético capaz de hematopoyesis, lo que incluye, pero no se limita a, células madre hematopoyéticas y/o células progenitoras hematopoyéticas (es decir, capaz de proliferar y al menos reconstituir parcialmente tipos de células sanguíneas diferentes, lo que incluye células eritroides, linfocitos y mielocitos). El término "células hematopoyéticas" como se usa en la presente descripción incluye, además, las células que se diferencian de las células madre hematopoyéticas y/o células progenitoras hematopoyéticas para formar células sanguíneas (es decir, tipos de células sanguíneas, lo que incluye células eritroides, linfocitos y mielocitos).

35 Una célula hematopoyética resistente al reconocimiento de un antígeno por un receptor de reconocimiento de antígeno significa que dicha célula no puede detectarse, unirse y/o reconocerse tan fácilmente por un receptor de reconocimiento de antígeno específico para dicho antígeno o que la detección, unión y/o reconocimiento está deteriorada, de modo que no pueden observarse efectos secundarios o estos se reducen durante una inmunoterapia mediante el uso de las células de la presente descripción.

45 Se dice que un antígeno es "resistente" al reconocimiento por un receptor o un anticuerpo si se expresa en una forma, de una manera, o en una densidad que inhibe o reduce la unión del receptor. O bien se une al menos 10 veces (y preferentemente 10 veces a 1.000 veces, más preferentemente 1.000 veces a 100.000 veces y lo más preferentemente 100.000 a 10.000.000 veces) menos al receptor en las mismas condiciones que lo hace el antígeno de tipo salvaje cuando se presenta en condiciones normales, o se une al receptor con al menos 10 veces (y preferentemente 10 veces a 1.000 veces, más preferentemente 1.000 veces a 100.000 veces y lo más preferentemente 100.000 a 10.000.000 veces) menor afinidad. En determinadas modalidades de la presente descripción, el antígeno se modifica de forma recombinante para inhibir o reducir la unión del receptor. Típicamente, un antígeno modificado de esta manera es más del 90 % idéntico a la isoforma de tipo salvaje a nivel de aminoácidos, pero se ha introducido de manera recombinante con al menos uno, dos, tres, cinco o más de cinco aminoácidos alterados, adiciones, o deleciones de aminoácidos que cambian la estructura de la proteína primaria, secundaria o terciaria con el objetivo de inhibir o reducir el reconocimiento del receptor. En otros casos, el antígeno puede modificarse (por ejemplo, acortar, alargar o truncar) para eliminar el motivo de unión. Sin embargo, la funcionalidad original del antígeno objetivo preferentemente no se afecta por la modificación.

60 A modo de ilustración, la célula hematopoyética resistente al reconocimiento de dicho antígeno por un receptor de reconocimiento de antígeno específico para dicho antígeno que se usa en el método o combinación de composiciones de la presente descripción puede generarse, por ejemplo, mediante el uso de un antígeno

- 1) que tiene al menos una variante de corte y empalme dentro del dominio extracelular de dicho antígeno adecuada para generar epítopos diferentes para dominios de unión a antígeno, o
- 2) que tiene al menos una forma polimórfica natural dentro del dominio extracelular de dicho antígeno adecuada para generar epítopos diferentes para dominios de unión a antígeno; o

- 3) que puede modificarse a una forma polimórfica no natural dentro del dominio extracelular de dicho antígeno adecuada para generar epítomos diferentes para dominios de unión a antígeno, en donde dicha forma polimórfica no natural no altera ni afecta la función natural de dicho antígeno en las células; o
- 4) que puede eliminarse (por ejemplo, anularse) sin alterar o afectar la función natural de la célula hematopoyética.

5

El resultado es una desviación en dicho antígeno, de manera que la célula hematopoyética no puede reconocerse por dicho receptor de reconocimiento de antígeno o puede reconocerse solo de forma mitigada.

10

El término "fratricida" se refiere a la observación de que el antígeno asociado con la enfermedad puede presentarse, además de en las células enfermas, en las células efectoras inmunitarias modificadas por ingeniería genética, tales como las células T que expresan un receptor de reconocimiento de antígeno, tales como un CAR. En ese caso, los efectos secundarios del receptor de reconocimiento de antígeno afectarán a las células efectoras inmunitarias modificadas por ingeniería genética para expresar el receptor de reconocimiento de antígeno. Dicho efecto secundario se conoce también en la técnica como fratricidio.

15

En general, el término "receptor" se refiere a una biomolécula que puede ser soluble o unida a la membrana de la superficie celular y se une específicamente a una estructura definida que puede unirse a una membrana de la superficie celular o ser soluble. Los receptores incluyen, pero no se restringen a, anticuerpos y estructuras similares a anticuerpos, moléculas de adhesión, TCR o CAR transgénicos o de origen natural. En concreto, el término "receptor de reconocimiento de antígeno" como se usa en la presente descripción puede ser un receptor soluble o unido a la membrana tal como un TCR natural, un TCR transgénico, un CAR, un scFv o multímeros de este, un fragmento Fab o multímeros de este, un anticuerpo o multímeros de estos, un potenciador de células T biespecíficas (BiTE, por sus siglas en inglés), un diacuerpo o cualquier otra molécula que pueda ejecutar una unión específica con afinidad alta.

20

25

El término "antígeno" se refiere a una entidad molecular que puede ser soluble o ligada a la membrana celular en particular pero no restringida a entidades moleculares que pueden reconocerse por medio del sistema inmunitario adaptativo, lo que incluye pero no se restringe a anticuerpos o TCR, o moléculas modificadas por ingeniería genética lo que incluye, pero no se restringe a TCR transgénicos, CAR, scFv o multímeros de estos, fragmentos Fab o multímeros de estos, anticuerpos o multímeros de estos, anticuerpos de cadena única o multímeros de estos, o cualquier otra molécula que pueda ejecutar la unión a una estructura con afinidad alta.

30

El término "objetivo" o "antígeno objetivo" se refiere a cualquier proteína de la superficie celular, glicoproteína, glicolípido o cualquier otra estructura presente en la superficie de la célula objetivo. Además, el término se refiere a cualquier otra estructura presente en las células objetivo en particular, pero no restringida a estructuras que pueden reconocerse por medio del sistema inmunitario adaptativo, lo que incluye pero no se restringe a anticuerpos o TCR, o moléculas modificadas por ingeniería genética, lo que incluye pero no se restringe a TCR transgénicos, CAR, scFv o multímeros de estos, fragmentos Fab o multímeros de estos, anticuerpos o multímeros de estos, anticuerpos de cadena única o multímeros de estos, o cualquier otra molécula que pueda ejecutar la unión a una estructura con afinidad alta.

35

40

El término "células objetivo", como se usa en la presente descripción, se refiere a células, las cuales deben reconocerse por el receptor de reconocimiento de antígeno que se aplica o se aplicará al individuo.

45

El término "célula no objetivo que expresa antígeno", como se usa en la presente descripción, se refiere a las células sanas (células no enfermas) de un individuo tratado con el método de la presente descripción, las cuales expresan el mismo antígeno que las células objetivo. El reconocimiento de dicho antígeno en las células no objetivo que expresan el antígeno no es deseable y puede conducir a complicaciones (efectos secundarios) en el tratamiento en la inmunoterapia del estado de la técnica.

50

Los términos "se une específicamente" o "específico para" o "reconoce específicamente" con respecto a un receptor de reconocimiento de antígeno se refiere a un dominio de unión a antígeno de dicho receptor de reconocimiento de antígeno que reconoce y se une a un antígeno específico, pero no reconoce o se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra. Un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno de una especie puede unirse también a ese antígeno de otra especie. Esta reactividad cruzada entre especies no es contraria a la definición de ese dominio de unión a antígeno como específico. Un dominio de unión a antígeno de un receptor de reconocimiento de antígeno que se une específicamente a un antígeno puede unirse, además, a formas alélicas diferentes del antígeno (variantes alélicas, variantes de corte y empalme, isoformas, etcétera). Esta reactividad cruzada no es contraria a la definición de ese dominio de unión a antígeno como específico, ya que estas formas alélicas diferentes del antígeno no participan en la derivación deseada del antígeno necesaria para la generación de la resistencia de las células hematopoyéticas al antígeno como se usa en la presente descripción.

55

60

El término "sistema para su uso en inmunoterapia" como se usa en la presente descripción, se refiere a la constelación de que se necesitan dos tipos de composiciones para realizar la inmunoterapia combinada como se describe en la presente descripción. Por lo tanto, el sistema (o conjunto o kit o la combinación de composiciones) comprende

65

a) un receptor de reconocimiento de antígeno en donde dicho receptor de reconocimiento de antígeno reconoce específicamente un antígeno en las células objetivo en dicho individuo;

b) células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento de dicho antígeno por dicho receptor de reconocimiento de antígeno.

5 "Receptor de antígeno quimérico" o "CAR" se refiere a los receptores modificados por ingeniería genética, que injertan una especificidad de antígeno en las células, por ejemplo, las células T. Los CAR de la presente descripción comprenden un dominio de unión a antígeno también conocido como región de direccionamiento de antígeno, un dominio espaciador extracelular o región bisagra, un dominio transmembrana y al menos un dominio de señalización intracelular o al menos un dominio coestimulador y al menos un dominio de señalización intracelular.

10 En general, un CAR puede comprender un dominio extracelular (parte extracelular) que comprende el dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. El dominio extracelular puede vincularse al dominio transmembrana por un enlazador. Además, el dominio extracelular puede comprender un péptido señal.

15 Un "péptido señal" se refiere a una secuencia peptídica que dirige el transporte y la localización de la proteína dentro de una célula, por ejemplo, a un determinado orgánulo celular (tal como el retículo endoplásmico) y/o a la superficie celular.

20 Un "dominio de unión a antígeno" se refiere a la región del CAR que se une específicamente a un antígeno (y de esta manera es capaz de dirigirse a una célula que contiene un antígeno). Los CAR de la presente descripción pueden comprender uno o más dominios de unión a antígeno. Generalmente, las regiones de direccionamiento en el CAR son extracelulares. El dominio de unión a antígeno puede comprender un anticuerpo o un fragmento de este. El dominio de unión a antígeno puede comprender, por ejemplo, cadena pesada de longitud completa, fragmentos Fab, fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena simple divalentes o diacuerpos. Cualquier molécula que se una específicamente a un antígeno dado, tales como los afficuerpos o los dominios de unión a ligandos de receptores de origen natural, puede usarse como un dominio de unión a antígeno. A menudo, el dominio de unión a antígeno es un scFv. Normalmente, en un scFv, las porciones variables de una cadena pesada y una cadena ligera de inmunoglobulina se fusionan mediante un enlazador flexible para formar un scFv. Dicho enlazador puede ser, por ejemplo, el "enlazador (G<sub>4</sub>/S<sub>1</sub>)<sub>3</sub>".

30 En algunos casos, es beneficioso que el dominio de unión a antígeno se derive de la misma especie en la cual se usará el CAR. Por ejemplo, cuando se planea usarlo terapéuticamente en seres humanos, puede ser beneficioso para el dominio de unión a antígeno del CAR comprender un anticuerpo humano o humanizado o un fragmento de estos. Los anticuerpos humanos o humanizados o fragmentos de estos pueden prepararse mediante una variedad de métodos que se conocen bien en la técnica.

35 "Espaciador" o "bisagra", como se usa en la presente descripción, se refiere a la región hidrófila que se encuentra entre el dominio de unión al antígeno y el dominio transmembrana. Los CAR de la presente descripción pueden comprender un dominio espaciador extracelular, pero también es posible prescindir de dicho espaciador. El espaciador puede incluir fragmentos Fc de anticuerpos o fragmentos de estos, regiones bisagras de anticuerpos o fragmentos de estos, regiones CH2 o CH3 de anticuerpos, proteínas accesorias, secuencias espaciadoras artificiales o sus combinaciones. Un ejemplo destacado de un espaciador es la bisagra CD8alfa.

45 El dominio transmembrana del CAR puede derivarse de cualquier fuente natural o sintética deseada para dicho dominio. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivarse de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana. El dominio transmembrana puede derivarse, por ejemplo, de CD8alfa o CD28. Cuando los módulos de señalización clave y de reconocimiento de antígeno están en dos (o incluso más) polipéptidos, entonces el CAR puede tener dos (o más) dominios transmembrana. La división de los módulos de señalización clave y de reconocimiento de antígeno permite un control reversible, titulable y dependiente de moléculas pequeñas sobre la expresión de células CAR (Wu y otros, 2015, Science 350: 293-303) debido a dominios de heterodimerización dependientes de moléculas pequeñas en cada polipéptido del CAR.

50 El dominio citoplasmático o el dominio de señalización intracelular del CAR es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la cual se expresa el CAR. "Función efectora" significa una función especializada de una celda, por ejemplo, en una célula T, una función efectora puede ser una actividad citolítica o una actividad cooperadora, lo que incluye la secreción de citocinas. El dominio de señalización intracelular se refiere a la parte de una proteína que transduce la señal de la función efectora y dirige a la célula que expresa el CAR para realizar una función especializada. El dominio de señalización intracelular puede incluir cualquier parte completa o troncada del dominio de señalización intracelular de una proteína dada suficiente para transducir la señal de la función efectora.

60 Ejemplos prominentes de dominios de señalización intracelular para su uso en los CAR incluyen las secuencias citoplasmáticas del receptor de células T (TCR) y los coreceptores que actúan concertadamente para iniciar la transducción de señales después del involucramiento del receptor de antígeno.

65 Generalmente, la activación de células T puede mediarse por dos clases distintas de secuencias de señalización citoplasmática, en primer lugar aquellas que inician la activación primaria dependiente del antígeno a través del TCR (secuencias de señalización citoplasmática primaria) y en segundo lugar las que actúan de manera independiente del

antígeno para proporcionar una señal coestimuladora o secundaria (secuencias de señalización citoplasmática secundaria, dominio de señalización coestimuladora). Por lo tanto, un dominio de señalización intracelular de un CAR puede comprender un dominio de señalización citoplasmático primario y/o un dominio de señalización citoplasmático secundario.

5

Las secuencias de señalización citoplasmática primaria que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización de motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina (ITAM, por sus siglas en inglés).

10

Los ejemplos de secuencias de señalización citoplasmática primaria que contienen ITAM que se usan a menudo en CAR son aquellos derivados del TCR zeta (CD3 zeta), FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. La más prominente es la secuencia derivada de CD3 zeta.

15

El dominio citoplasmático del CAR puede diseñarse para comprender el dominio de señalización CD3-zeta por sí mismo o combinado con cualquier otro(s) dominio(s) citoplasmático(s) deseado(s). El dominio citoplasmático del CAR puede comprender una porción de cadena de CD3 zeta y una región de señalización coestimuladora. La región de señalización coestimuladora se refiere a una parte del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que se requiere para una respuesta eficiente de los linfocitos a un antígeno. Ejemplos de una molécula coestimuladora son CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno-1 asociado a la función del linfocito (LFA-1, por sus siglas en inglés), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3.

20

Las secuencias de señalización citoplasmática dentro de la parte de señalización citoplasmática del CAR pueden vincularse entre sí en un orden aleatorio o especificado. Un enlazador oligopeptídico o polipeptídico corto, que tiene preferentemente una longitud de entre 2 y 10 aminoácidos, puede formar el enlace. Un enlazador prominente es el doblete glicina-serina.

25

Como un ejemplo, el dominio citoplasmático puede comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28. En otro ejemplo, el dominio citoplasmático puede comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD27. En un ejemplo adicional, el dominio citoplasmático puede comprender el dominio de señalización de CD3-zeta, el dominio de señalización de CD28 y el dominio de señalización de CD27.

30

Como se mencionó anteriormente, la parte extracelular o el dominio transmembrana o el dominio citoplasmático de un CAR pueden comprender, además, un dominio de heterodimerización con el objetivo de dividir los módulos de señalización clave y de reconocimiento de antígenos del CAR.

35

El CAR de la presente descripción puede diseñarse para comprender cualquier porción o parte de los dominios mencionados anteriormente como se describe en la presente descripción en cualquier combinación que resulte en un CAR funcional.

40

Para calificar como un "receptor de antígeno quimérico" en las modalidades de la presente descripción descritas más abajo, un CAR tiene mínimamente al menos una región variable específica de antígeno (típicamente una región variable de cadena única que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpo) unida a un dominio de señalización de células T: típicamente un dominio intracelular de un receptor de células T, ejemplificado por (pero no limitado a) el dominio zeta de CD3. Tras la unión de la región específica de antígeno al antígeno correspondiente, el dominio de señalización de células T media una función de células T en la célula huésped (tal como citotoxicidad). El CAR puede opcionalmente, pero no necesariamente, comprender dominios adicionales, tales como un enlazador, un dominio transmembrana y otros elementos de señalización intracelular como se describió anteriormente.

45

El término "modificación genética" o modificado genéticamente "se refiere a la alteración del contenido de ácido nucleico, lo que incluye, pero no se restringe al ADN genómico de una célula. Esto incluye pero no se restringe a la alteración de una secuencia de ADN genómico de células mediante la introducción, intercambio o eliminación de nucleótidos individuales o fragmentos de secuencia de ácidos nucleicos. Además, el término se refiere a cualquier introducción de ácido nucleico en una célula independiente de si esto conduce a una alteración directa o indirecta de la secuencia del ADN genómico de las células o no.

50

Los términos "célula modificada por ingeniería genética" y "célula modificada genéticamente", como se usan en la presente, pueden usarse indistintamente. Los términos significan que contienen y/o expresan un gen o secuencia de ácido nucleico extraños, que a su vez modifica el genotipo o el fenotipo de la célula o su progenie. Especialmente, los términos se refieren al hecho de que las células pueden manipularse mediante métodos recombinantes que se conocen bien en la técnica para expresar péptidos o proteínas estables o transitorios, las cuales no se expresan en estas células en el estado natural. La modificación genética de las células puede incluir, pero no se restringe a, transfección, electroporación, nucleofección, transducción mediante el uso de vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores retro o lentivirales no integradores, transposones, nucleasas de diseño lo que incluye nucleasas con dedos de zinc, TALEN o CRISPR/Cas.

60

El término "cantidad eficaz terapéuticamente" significa una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico.

65

La inmunoterapia es un término médico definido como "tratamiento de una enfermedad mediante la inducción, potenciación o supresión de una respuesta inmunitaria". Las inmunoterapias diseñadas para provocar o amplificar una respuesta inmunitaria se clasifican como inmunoterapias de activación, mientras que las inmunoterapias que reducen o suprimen se clasifican como inmunoterapias de supresión. La inmunoterapia contra el cáncer como inmunoterapia activadora intenta estimular el sistema inmunitario para rechazar y destruir los tumores. La transferencia adoptiva de células usa respuestas citotóxicas basadas en células para atacar a las células cancerosas. Las células inmunitarias tales como las células T que tienen una reactividad natural o modificada por ingeniería genética para el cáncer de un paciente se generan *in vitro* y después se transfieren de vuelta al paciente con cáncer.

El término "tratamiento" como se usa en la presente descripción, significa reducir la frecuencia o severidad de al menos un signo o síntoma de una enfermedad.

Como se usa en la presente descripción, el término "individuo" se refiere a un animal. Preferentemente, el individuo es un mamífero tal como ratón, rata, vaca, cerdo, cabra, pollo, perro, mono o ser humano. Con mayor preferencia, el individuo es un ser humano. El individuo puede ser un individuo que padece una enfermedad tal como el cáncer (un paciente), pero el sujeto puede ser también un sujeto sano.

Las secuencias de aminoácidos de  $V_H$  de CD20 antihumano,  $V_L$  de CD20 antihumano, se proporcionan en la sec. con núm. de ident.: 1 y sec. con núm. de ident.: 2, respectivamente (en el código de una letra de aminoácidos). Las secuencias de aminoácidos (proteínas, polipéptidos) como se proporcionan en la sec. con núm. de ident.: 1 y la sec. con núm. de ident.: 2 se refieren a todas las constelaciones de la secuencia de aminoácidos respectiva que retiene la función deseada de la secuencia de aminoácidos respectiva como se define en la presente descripción. En otras palabras, las divergencias entre la sec. con núm. de ident.: 1 y la sec. con núm. de ident.: 2, respectivamente, no deberían afectar su potencial como unión específica al antígeno CD20 y/o al ser un CAR funcional. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1 y la sec. con núm. de ident.: 2 pueden ser la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la sec. con núm. de ident.: 1 y la sec. con núm. de ident.: 2, respectivamente. Además, puede ser una variante de esta que tenga algunos aminoácidos eliminados, agregados o reemplazados mientras retiene aún la función prevista como se describe en la presente descripción. Por lo tanto, en esta definición se incluyen variantes de las secuencias de aminoácidos en la sec. con núm. de ident.: 1 y sec. con núm. de ident.: 2, respectivamente, tales como secuencias de aminoácidos similares esencialmente a la sec. con núm. de ident.: 1 y sec. con núm. de ident.: 2, respectivamente, que tienen una identidad de secuencia de al menos 70 %, o al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % al nivel de secuencia de aminoácidos. En el contexto de la presente descripción, la "identidad de secuencia" puede determinarse mediante el uso de alineación por pares mediante el uso de programas de alineación para secuencias de aminoácidos que se conocen bien en la técnica.

## EJEMPLOS

Ejemplo 1: Direccionamiento al antígeno CD20 con un CAR que reconoce a CD20 expresado en células T donde 2 aminoácidos del antígeno CD20 de tipo salvaje se han mutado para anular el reconocimiento de CD20 por el receptor de reconocimiento de antígeno.

En un primer caso, hemos usado células HEK 293 T para sobreexpresar varias variantes del antígeno CD20 humano (las secuencias se sintetizaron mediante ADN 2.0 y se clonaron en el plásmido pMACS LNGFR-IRES de Miltenyi Biotec). La Figura 2 muestra cómo las mutaciones de los aminoácidos A en S en la posición 170 y P en S en las posiciones 172 del antígeno CD20 humano de tipo salvaje (sec. con núm. de ident.: 3) anulan la unión del clon de anticuerpo anti-CD20 2H7.

Se generó un CAR que codifica el receptor de reconocimiento de antígeno del 2H7 (ver sec. con núm. de ident. 1 y 2) con un espaciador extracelular IgG1, un dominio transmembrana CD8 y un dominio de señalización intracelular de 4-1BB-CD3 zeta en un vector lentiviral (proporcionado por Lentigen Technology, Inc., EE.UU.). Las células T humanas se activaron con el kit MACS GMP TransAct (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, se transdujeron con el vector lentiviral CAR de CD20 codificante a una multiplicidad de infección de 2 y se expandieron en medio TexMACS con IL-2 humana 20 ng/ml (Miltenyi Biotec) durante 14 días. Las células T transducidas con CAR se cocultivaron después durante 24 horas en una relación de 1 a 1 con las células objetivo indicadas en la Figura 2. La Figura 3 muestra las mediciones de GM-CSF e IL-2 expresadas por las células T con CAR en el sobrenadante del cultivo (mediante el uso del sistema de medición de citocinas MACSPlex™ de Miltenyi Biotec). Las células T con CAR producen específicamente citocinas en presencia de células T HEK-293 que expresan el antígeno CD20 de tipo salvaje, pero no cuando las células T HEK-293 expresan el antígeno CD20 mutante.

Por lo tanto, mediante el uso de la edición de genes menores, es posible mantener la expresión del antígeno CD20 mientras se anula el reconocimiento por las células T que expresan el receptor de reconocimiento de antígeno.

Pueden usarse varios métodos para editar genes. Para ilustrar la posibilidad de cambiar la expresión de CD20 humano de tipo salvaje a la expresión de la forma mutante, hemos electroporado la línea celular Raji (la cual expresa naturalmente CD20 de tipo salvaje) con la nucleasa Cas9, el ARN guía indicado (ver Figura 4 y sec. con núm. de ident.: 4 a sec. con núm. de ident.: 9) y un control de transfección que codifica GFP mediante el uso de los plásmidos. La Figura 4 muestra

que la mejor "pérdida" de la tinción de APC con CD20 se obtuvo mediante el uso del ARNg2 (15 % de las células transfectadas con GFP).

5 La Figura 4 representa la prueba del principio de que puede alterarse un epítipo de un antígeno expresado por las células. De esta forma, una célula objetivo puede convertirse en una no-objetivo para un receptor de reconocimiento de antígeno dado expresado por una célula efectora dada.

10 En este ejemplo, el antígeno CD20 no se expresa por las células T, por lo tanto no sería necesario editar el gen del antígeno en las células T para evitar el fratricidio. Sin embargo, en esta solicitud, las células madre hematopoyéticas (del mismo donante de células T) se editarían (de manera similar a la Figura 4) para que la progenie de las HSC no se reconozca por las células T con CAR CD20. Por lo tanto, el paciente con células objetivo positivas para CD20 de tipo salvaje, tales como células tumorales, pero también células B sanas que expresan el CD20 de tipo salvaje, se depletaría de todas las células positivas para CD20 originales (células tumorales y células B sanas), pero las células B sanas con antígeno CD20 mutado serían capaces de repoblar al paciente lo que reduce de esta manera la aplasia sostenida de células B.

Ejemplo 2: Uso de un receptor de reconocimiento de antígenos para apuntar a un antígeno presente en la mayoría de las células hematopoyéticas, lo que incluye las células T.

20 En este ejemplo, hemos tomado ventaja del polimorfismo de CD45 en modelos de ratón.

25 Como se indica en la Figura 5, se conocen las diferencias de aminoácidos que guían el polimorfismo de las isoformas CD45.1 y CD45.2 en ratones C57BL/6. Puede generarse anticuerpos que reconocen específicamente las 2 isoformas por separado. Existen dichos anticuerpos, los cuales reconocen la isoforma CD45.2 o CD45.1 de la molécula de superficie CD45 del ratón. Sin embargo, en este modelo se desconoce qué epítopos reconocen los anticuerpos existentes. Por lo tanto, hemos usado plásmidos que codifican la secuencia de tres mutantes diferentes de la isoforma CD45.2 o la CD45.2 de tipo salvaje para forzar la expresión de dichos antígenos en la línea celular HEK-293T.

30 Como se indica en la Figura 6, la mutación del aminoácido K en la posición 277 a E permite que el anticuerpo anti-CD45.1 se una al antígeno y anula la unión del anticuerpo anti-CD45.2. Los otros 2 constructos mantienen la especificidad para el anticuerpo CD45.2.

35 Por lo tanto, es posible usar el anticuerpo anti-CD45.2 para generar un CAR que reconozca anti-CD45.2 que sería "ciego" al K en la posición 277 a la mutación E, o viceversa para usar el anticuerpo anti-CD45.1 para generar un CAR que reconozca al anti-CD45.1 que sería "ciego" a la K en la posición 277.

40 De manera similar al ejemplo 1 y como se muestra en la Figura 7, el CD45.2 expresado en la superficie de la línea celular 1881 podría ser, en parte, editado génicamente con el ARNg sec. con núm. de ident.: 12 y sec. con núm. de ident.: 13 y la nucleasa cas9 para no reconocerse por el anticuerpo CD45.2.

La Figura 8 representa polimorfismos conocidos del antígeno CD45 humano. Varias formas se asocian con la enfermedad, mientras que otras no lo están.

45 Ejemplo 3: Edición de antígenos presentes en malignidades asociadas a precursores tempranos de HSC y/o HSC.

50 En este ejemplo, los antígenos asociados a la enfermedad están presentes, además, en las HSC sanas, pero no en las células T. Se definen polimorfismos de antígenos tales como CD34 o CD133, y se definen receptores de reconocimiento de antígenos que pueden dirigirse específicamente a los antígenos de tipo salvaje pero no a mutaciones específicas del antígeno de tipo salvaje. Como en el ejemplo 3, las HSC sanas se purifican (por ejemplo, mediante el uso de un clasificador de células y marcadores capaces de diferenciar las HSC sanas de las enfermas o las malignas), se edita el gen y se infunden en el paciente. Las células T del mismo paciente se modifican después para expresar el receptor de reconocimiento de antígeno sin la necesidad de editarlo para el antígeno.

Listado de secuencias

SEC. CON NÚM. DE IDENT.:1 dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) de CD20 anti-humano

5 MAQVKLQESG AELVKPGASV KMSCKASGYT FTSYNMHWVK QTPGQGLEWI  
 GAIYPGNGDT SYNQKFKGKA TLTADKSSST AYMQLSSLTS EDSADYYCAR  
 SNYYGSSYWF FDVWGQGTTV TVSS

SEC. CON NÚM. DE IDENT.:2 dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) de CD20 anti-humano

10 DIELTQSPTI LSASPGEKVT MTCRASSSVN YMDWYQKKPG SSPKPWIYAT  
 15 SLASGVPARF SGSGSGTSYS TISRVEAEDA ATYYCQWSF NPPTFGGGTK LEIK

SEC. CON NÚM. DE IDENT.:3 CD20 humano de tipo salvaje

20 MTTPRNSVNG TFFAEPMKGP IAMQSGPKPL FRRMSSLVGP TQSFFMRESK  
 TLGAVQIMNG LFHIALGGLL MIPAGIYAPI CVTVWYPLWG GIMYIISGSL  
 LAATEKNSRK CLVKGKMIMN SLSLFAAISG MILSIMDILN IKISHFLKME  
 25 SLNFIRAHTP YINIYNCEPA NPSEKNPST QYCYSIQSLF LGILSVMLIF  
 AFFQELVIAG IVENEWKRTC SRPKSNIVLL SAEKKEQTI EIKEEVVGLT  
 30 ETSSQPKNEE DIEIPIQEE EEEETETNFP EPPQDQESSP IENDSSP

SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 4 Sitio objetivo 1 Rev G19nGG (CD20 ARNg1) Oligo Directo  
 ACACCGATGG GGAGTTTTTC TCAGAG

35 SEC. CON NÚM. DE IDENT.:5 Sitio objetivo 1 Inverso G19nGG (CD20 ARNg1) Oligo Inverso  
 AAAACTCTGA GAAAACTCC CCATCG

SEC. CON NÚM. DE IDENT.: 6 Sitio objetivo 2 Inverso G19nGG (CD20 ARNg2) Oligo Directo  
 ACACCGTAAC AGTATTGGGT AGATGG

40 SEC. CON NÚM. DE IDENT.:7 Sitio objetivo 2 Inverso G19nGG (CD20 ARNg2) Oligo Inverso  
 AAAACCATCT ACCCAATACT GTTACG

SEC. CON NÚM. DE IDENT.:8 Sitio objetivo 5 Inverso G17nGG (CD20 ARNg3) Oligo Directo  
 45 ACACCGTATG CTGTAACAGT ATTG

SEC. CON NÚM. DE IDENT.:9 Sitio objetivo 5 Inverso G17nGG (CD20 ARNg3) Oligo Inverso  
 AAAACAATAC TGTTACAGCA TACG

50 SEC. CON NÚM. DE IDENT.:10 Sitio objetivo 1 Inverso G18nGG (CD45.2 ARNg1) Oligo Directo  
 ACACCGTTGC ATTTTCTGAA ATCAG

SEC. CON NÚM. DE IDENT.:11 Sitio objetivo 1 Inverso G18nGG (CD45.2 ARNg1) Oligo Inverso  
 AAAACTGATT TCAGAAAATG CAACG

55 SEC. CON NÚM. DE IDENT.:12 Sitio objetivo 2 Directo G19nGG (CD45.2 ARNg2) Oligo Directo  
 ACACCGGCTA AACTTCAAT TTGTTG

60 SEC. CON NÚM. DE IDENT.:13 Sitio objetivo 2 Directo G19nGG (CD45.2 ARNg2) Oligo Inverso  
 AAAACAACAA ATTGAAGTAT TAGCCG

Listado de secuencias

<110>MiltenyiBiotec GmbH

65

ES 2 692 206 T3

<120> Inmunoterapia combinada de receptores de reconocimiento de antígenos y células hematopoyéticas para el tratamiento de enfermedades

<130> Mil\_075

5

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.5

10

<210> 1

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) de CD20 anti-humano

<400> 1

20

Met Ala Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro  
1 5 10 15

25

Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
20 25 30

30

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu  
35 40 45

35

Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln  
50 55 60

40

Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr  
65 70 75 80

Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Asp Tyr  
85 90 95

45

Tyr Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Phe Phe Asp  
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

50

<210> 2

<211> 104

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

55

<220>

<223> dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) de CD20 anti-humano

<400> 2

60

65

ES 2 692 206 T3

5 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Thr Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

10 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met  
 20 25 30

15 Asp Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
 35 40 45

20 Ala Thr Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
 50 55 60

25 Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala  
 65 70 75 80

30 Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly  
 85 90 95

35 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100

40 <210> 3  
 <211> 297  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

45 <400> 3

50 Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu Pro  
 1 5 10 15

55 Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe Arg  
 20 25 30

60 Arg Met Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu  
 35 40 45

65 Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile  
 50 55 60

70 Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile  
 65 70 75 80

75 Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile  
 85 90 95

80 Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu  
 100 105 110

ES 2 692 206 T3

5 Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile  
115 120 125

10 Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser  
130 135 140

15 His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro  
145 150 155 160

20 Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn  
165 170 175

25 Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly  
180 185 190

30 Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile  
195 200 205

35 Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys  
210 215 220

40 Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile  
225 230 235 240

45 Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro  
245 250 255

50 Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu  
260 265 270

55 Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser  
275 280 285

60 Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro  
290 295

50 <210> 4  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

55 <220>  
<223> Sitio objetivo 1 Inverso G19nGG (CD20 ARNg1) Oligo Directo

60 <400> 4  
acaccgatggggagttttctcagag 26

65 <210> 5  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

65 <220>

# ES 2 692 206 T3

<223> Sitio objetivo 1 Inverso G19nGG (CD20 ARNg1) Oligo Inverso

5 <400> 5  
aaaactctgagaaaaactccccatcg 26

<210> 6  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Sitio objetivo 2 Inverso G19nGG (CD20 ARNg2) Oligo Directo

15 <400> 6  
acaccgtaacagtattggtagatgg 26

<210> 7  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Sitio objetivo 2 Inverso G19nGG (CD20 ARNg2) Oligo Inverso

25 <400> 7  
aaaaccatctaccaataactgttacg 26

<210> 8  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

30 <220>  
<223> Sitio objetivo 5 Inverso G17nGG (CD20 ARNg3) Oligo Directo

35 <400> 8  
acaccgatgctgtaacagtattg 24

<210> 9  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

40 <220>  
<223> Sitio objetivo 5 Inverso G17nGG (CD20 ARNg3) Oligo Inverso

45 <400> 9  
aaaacaataactgttacagcatcag 24

<210> 10  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

50 <220>  
<223> Sitio objetivo 1 Inverso G18nGG (CD45.2 ARNg1) Oligo Directo

55 <400> 10  
acaccgttcattttctgaaatcag 25

60 <210> 11  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

65 <220>

# ES 2 692 206 T3

<223> Sitio objetivo 1 Inverso G18nGG (CD45.2 ARNg1) Oligo Inverso

<400> 11  
5 aaaactgatttcagaaaatgcaacg 25

<210> 12  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Sitio objetivo 2 Directo G19nGG (CD45.2 ARNg2) Oligo Directo

<400> 12  
15 acaccggctaataactcaattgttg 26

<210> 13  
<211> 26  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Sitio objetivo 2 Directo G19nGG (CD45.2 ARNg2) Oligo Inverso

25 <400> 13  
aaaacaacaaattgaagtattagccg 26

Reivindicaciones

1. Una combinación de composiciones para su uso en inmunoterapia para reducir los efectos secundarios de un receptor de reconocimiento de antígeno expresado en la membrana celular de células efectoras inmunitarias contra células no objetivo que expresan antígeno en un individuo, que comprende
  - a) dicho receptor de reconocimiento de antígeno expresado en la membrana celular de células efectoras inmunitarias en donde dicho receptor de reconocimiento de antígeno reconoce específicamente un antígeno en células objetivo en dicho individuo;
  - b) células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento de dicho antígeno por dicho receptor de reconocimiento de antígeno, en donde dichas células hematopoyéticas tienen una desviación en dicho antígeno, y en donde dicho antígeno tiene dicha desviación
    - i) tiene al menos una variante de corte y empalme dentro del dominio extracelular de dicho antígeno adecuada para generar epítomos diferentes para dominios de unión a antígeno, o
    - ii) tiene al menos una forma polimórfica natural dentro del dominio extracelular de dicho antígeno adecuada para generar epítomos diferentes para dominios de unión a antígeno; o
    - iii) se modifica a una forma polimórfica no natural dentro del dominio extracelular de dicho antígeno adecuada para generar epítomos diferentes para dominios de unión a antígeno, en donde dicha forma polimórfica no natural no altera ni afecta la función natural de dicho antígeno en las células; o
    - iv) se elimina sin alterar o afectar la función natural de la célula hematopoyética, en donde dicho antígeno se expresa en células objetivo en dicho individuo y al menos en un tipo de célula hematopoyética de dicho individuo.
2. La combinación de composiciones para su uso de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicho receptor de reconocimiento de antígeno se selecciona del grupo que consiste en CAR, TCR y receptor natural.
3. La combinación de composiciones para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dichas células objetivo son células premalignas, células malignas o células infectadas con patógenos virales, parasitarios o bacterianos.
4. La combinación de composiciones para su uso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dichas células efectoras inmunitarias que expresan dicho receptor de reconocimiento de antígeno y dichas células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento de dicho antígeno por dicho receptor de reconocimiento de antígeno son las mismas células, lo que evita de esta manera el fratricidio.
5. La combinación de composiciones para su uso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dichas células hematopoyéticas son células madre hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas.
6. La combinación de composiciones para su uso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dichas células efectoras inmunitarias que expresan dicho receptor de reconocimiento de antígeno son trasplantes autólogos o alogénicos y en donde dichas células hematopoyéticas resistentes al reconocimiento de dicho antígeno por dicho receptor de reconocimiento de antígeno son trasplantes autólogos o alogénicos.
7. La combinación de composiciones para su uso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho antígeno se selecciona del grupo que consiste en CD11a, CD18, CD19, CD20, CD31, CD34, CD44, CD45, CD47, CD51, CD58, CD59, CD63, CD97, CD99, CD100, CD102, CD123, CD127, CD133, CD135, CD157, CD172b, CD217, CD300a, CD305, CD317 y CD321.
8. La combinación de composiciones para su uso de conformidad con la reivindicación 7, en donde dicho antígeno es CD20, y en donde dicho receptor de reconocimiento de antígeno es un CAR, y en donde el dominio de unión a antígeno de dicho CAR comprende las secuencias de aminoácidos sec. con núm. de ident.: 1 (V<sub>H</sub>) y sec. con núm. de ident.: 2 (V<sub>L</sub>), y en donde dicha desviación en dicho antígeno de dichas células hematopoyéticas es la sustitución de aminoácido alanina a serina en la posición 170 y/o prolina a serina en la posición 172 de dicho antígeno CD20, en donde la secuencia de aminoácidos de dicho antígeno CD20 se proporciona en la sec. con núm. de ident.: 3.

Figura 1

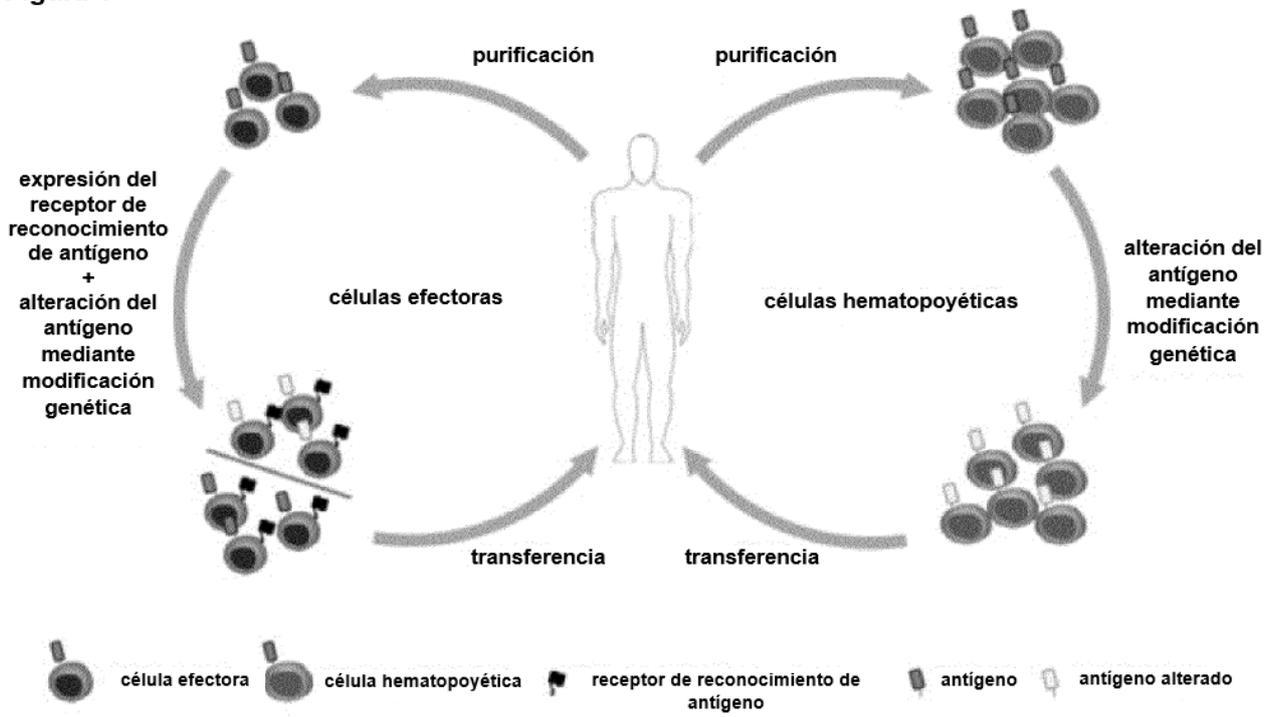


Figura 2

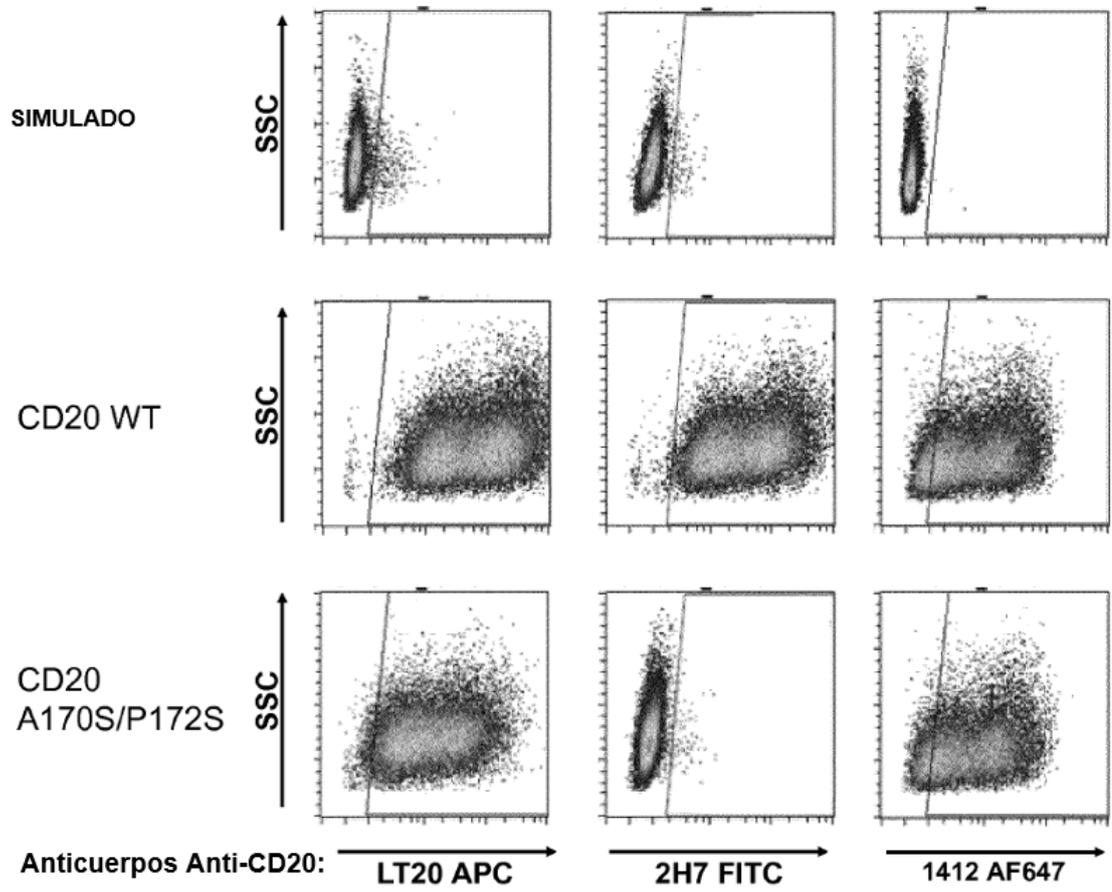


Figura 3

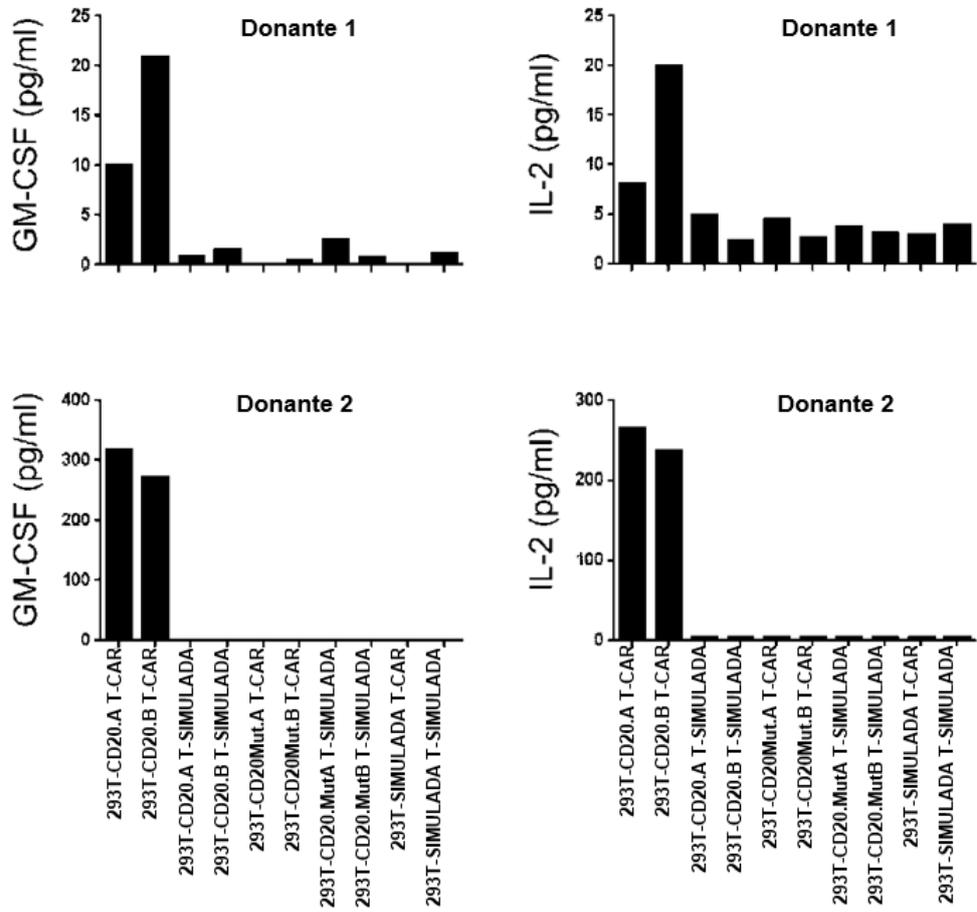


Figura 4

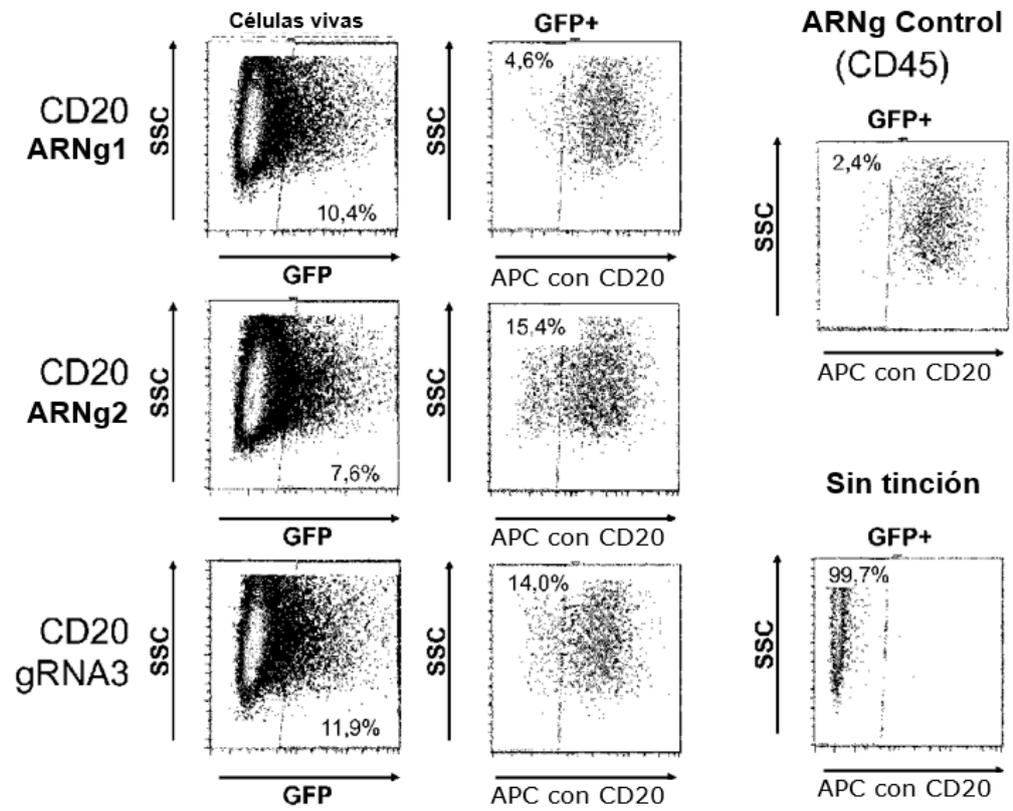


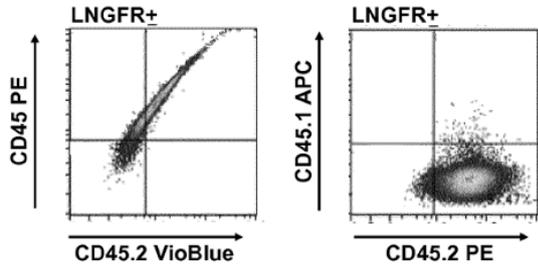
Figura 5

Comparación de cambios en la secuencia de *Ly5<sup>a</sup>* y *Ly5<sup>b</sup>*

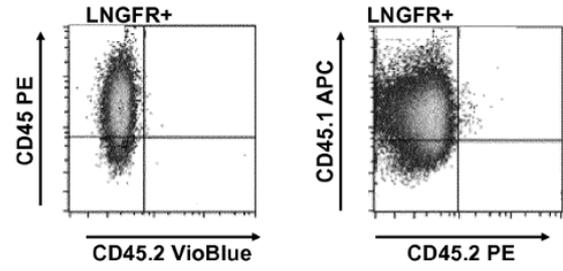
Posición del nucleótido <sup>2</sup>		Nucleótido		Posición del aminoácido	Residuo		Dominio de proteína <sup>b</sup>
		CD45.2	CD45.1		CD45.2	CD45.1	
943	Exón 10	A	G	277	K	E	Extracelular
1238		T	C	375	V	A	Extracelular
1251	Exón 12	G	T	379	E	D	Extracelular
1252		T	C	380	S	P	Extracelular
1461		G	A	449	—		Extracelular
1472	Exón 14	A	C	453	N	T	Extracelular

**Figura 6**

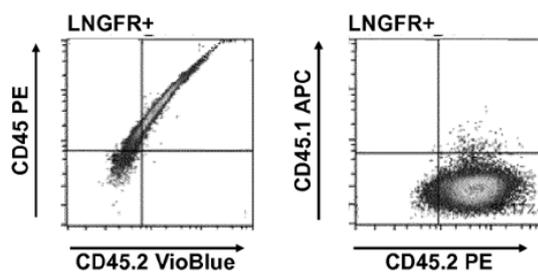
pMACS-Ptprc<sup>b</sup>(WT)-IRES-LNGFR



pMACS-Ptprc<sup>b</sup>(K277E)- IRES-LNGFR



pMACS-Ptprc<sup>b</sup>(V375A/E379D/S380P)-IRES-LNGFR



pMACS-Ptprc<sup>b</sup>(N453T)-IRES-LNGFR

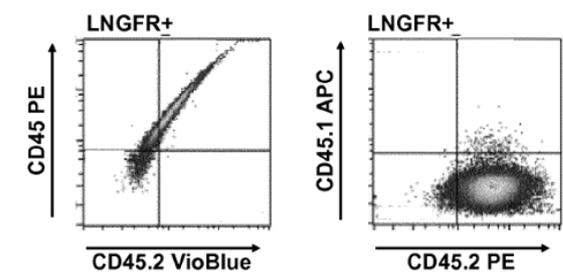


Figura 7

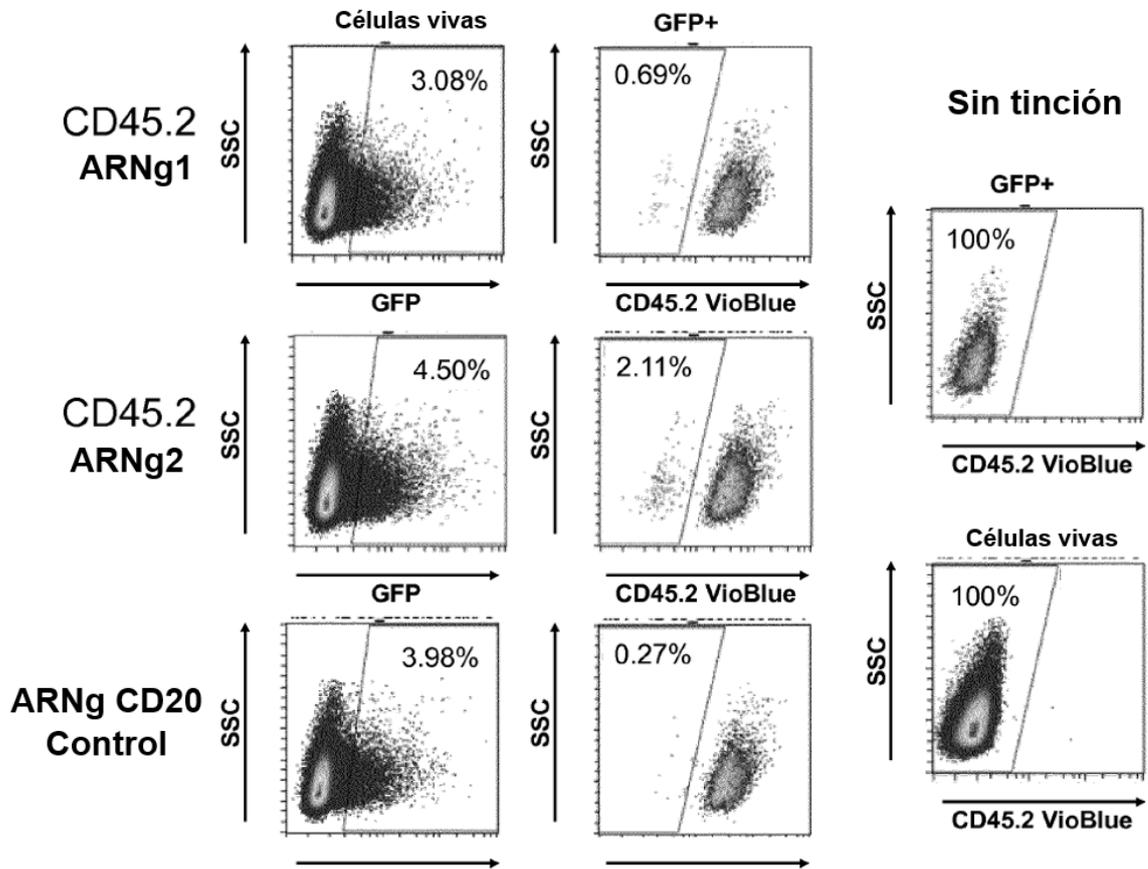


Figura 8

Variantes de secuencia de codificación identificadas en PTPRC (CD45 humano)

Designación <sup>1</sup>	Núm. AA <sup>2</sup>	Posición del codón <sup>3</sup>	Identidad de base		Fenotipo <sup>4</sup>	Fenotipo <sup>5</sup>
			Mayor	Menor		
e4_A54G	27	1	A	G	Thr→Ala, corte y empalme	ND
e4_C59A	28	3	C	A	His→Gln, corte y empalme	ND
e4_C 77G	34	3	C	G	Corte y empalme	0-011
e4_C 77T	34	3	C	T	Sinónimos, corte y empalme	ND
e5_G69C	98	1	G	C	Asp→His	ND
e6_T127A	164	2	T	A	Ile→Asn	ND
e6_A138G	168	1	A	G	Thr→Ile corte y empalme	0-015 0-237 <sup>6</sup>
rs12129883	261	1	A	C	Ile→Leu	0-005
rs2274367	304	1	G	A	Glu→Lys	ND
rs6696162	398	2	C	T	Thr→Ile	ND
rs12136658	545	3	T	A	His→Gln	ND
rs7540378	747	3	C	T	<b>Sinónimos</b>	ND
rs1058191	1253	3	T	C	<b>Sinónimos</b>	0-02
rs2298872	1260	1	A	C	Ser→Arg	0-003

ND, datos insuficientes

<sup>1</sup>Cuando existe un nombre publicado, se usa este prefijado con el número de exón, de cualquier otra manera se usa el núm. de id. dbSNP.<sup>2</sup>Aminoácidos numerados a partir del extremo N-terminal maduro del CD45ABC.<sup>3</sup>Posición de variación dentro del codón de aminoácido.<sup>4</sup>Efectos fenotípicos conocidos; existen probablemente otros efectos.<sup>5</sup>Frecuencia de alelos, cuando se evidencia en Caucásicos, excepto para <sup>6</sup>, varía entre poblaciones.<sup>6</sup>En Japoneses.