

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 000**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01)
C07K 19/00	(2006.01)
C07K 14/705	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61K 35/14	(2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.03.2012 PCT/US2012/029861**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012 WO12138475**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2012 E 12710856 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2694549**

54 Título: **Receptores de antígenos quiméricos anti-variante III de receptor de factor de crecimiento epidérmico y uso de los mismos para el tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:

08.04.2011 US 201161473409 P

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

11.01.2019

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (100.0%)
Office of Technology Transfer National Institutes
of Health 6011 Executive Boulevard Suite 325
MSC 7660
Bethesda, Maryland 20892-7660, US**

72 Inventor/es:

**MORGAN, RICHARD A. y
ROSENBERG, STEVEN A.**

74 Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

ES 2 696 000 T3

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

DESCRIPCIÓN

Receptores de antígenos quiméricos anti-variante III de receptor de factor de crecimiento epidérmico y uso de los mismos para el tratamiento de cáncer

Antecedentes de la invención

5 La American Cancer Society estima que se desarrollarán aproximadamente 20.500 nuevos casos de tumores del sistema nervioso y cerebrales primarios y aproximadamente 12.740 pacientes morirán en los EE.UU. cada año (Jemal *et al.*, *Cancer J. Clin.*, 57:43-66 (2007)) como resultado de estos cánceres. Los tumores cerebrales representan aproximadamente del 85 al 90% de todos los tumores malignos del sistema nervioso central. El glioblastoma es el glioma más agresivo y más común representando el 51% de todos los gliomas (CBTRUS 2008
10 Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States -CBTRUS, 2000-2004 (2008)). A pesar de los avances en los tratamientos convencionales tales como resección quirúrgica, radioterapia y quimioterapia, el pronóstico para los gliomas, así como otros tipos de cáncer del cerebro y sistema nervioso, puede ser malo. Por ejemplo, la mayoría de los pacientes con glioblastoma multiforme (GBM) sobreviven menos de 15 meses desde el diagnóstico. Por consiguiente, existe una necesidad no satisfecha de tratamientos adicionales para el cáncer, particularmente
15 gliomas. El documento WO/2008/045437 da a conocer un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende scFv MR1 murino contra EGFRvIII, dominio transmembrana y bisagra de CD8alfa y dominio de señalización de CD3zeta. Bullain *et al.*, *Journal of Neuro-Oncology*, 94:373-382 (2009) dan a conocer el mismo CAR basado en MR1 que el documento WO/2008/045437. El documento WO/2005/010151 da a conocer anticuerpos monoclonales (AcM) humanos específicos para EGFRvIII, incluyendo AcM 139.

Breve resumen de la invención

Una realización de la invención proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio bisagra extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización de células T intracelular, en el que el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 2, preferiblemente
25 en el que el dominio de unión a antígeno comprende (a) un péptido ligador que comprende SEQ ID NO: 3; (b) una secuencia líder que comprende SEQ ID NO: 4; y/o (c) SEQ ID NO: 5. Realizaciones adicionales de la invención proporcionan ácidos nucleicos relacionados, vectores de expresión recombinante, células huésped, poblaciones de células y composiciones farmacéuticas relacionadas con los CAR de la invención.

Realizaciones adicionales de la invención proporcionan métodos de detección de la presencia de cáncer en un huésped y usos médicos para prevenir el cáncer en un huésped.

Breve descripción de las varias vistas del/de los dibujo(s)

La figura 1A es un gráfico que muestra la lisis específica (porcentaje de lisis) de línea celular de tumor de glioblastoma U87 original marcada con ⁵¹Cr ("U87") (célula diana) por linfocitos de sangre periférica humanos (PBL) (células efectoras) que no se transdujeron (UnTd) (■) o se transdujeron con vectores que codifican para proteína fluorescente verde (GFP) (●), SEQ ID NO: 10 (CAR de h139Ab-hCD828BBZ) (x) o SEQ ID NO: 11 (h139Ab-hCD28Z) (▲) a diversas razones de efector con respecto a diana (razón E:T).

La figura 1B es un gráfico que muestra la lisis específica (porcentaje de lisis) de la línea celular de tumor de glioblastoma (célula diana) U87-GFP marcada con ⁵¹Cr (que expresa GFP) por PBL humanos (células efectoras) que no se transdujeron (UnTd) (■) o se transdujeron con vectores que codifican para GFP (●), SEQ ID NO: 10 (CAR de h139Ab-hCD828BBZ) (x) o SEQ ID NO: 11 (h139Ab-hCD28Z) (▲) a diversas razones de efector con respecto a diana (razón E:T).

Figura 1C es un gráfico que muestra la lisis específica (porcentaje de lisis) de la línea celular de tumor de glioblastoma U87-EGFR marcada con ⁵¹Cr (que expresa receptor de factor de crecimiento epidérmico silvestre) (célula diana) por PBL humanos (células efectoras) que no se transdujeron (UnTd) (■) o se transdujeron con vectores que codifican para GFP (●), SEQ ID NO: 10 (CAR de h139Ab-hCD828BBZ) (x) o SEQ ID NO: 11 (h139Ab-hCD28Z) (▲) a diversas razones de efector con respecto a diana (razón E:T).

La figura 1D es un gráfico que muestra la lisis específica (porcentaje de lisis) de la línea celular de tumor de glioblastoma U87-vIII marcada con ⁵¹Cr (que expresa EGFRvIII) (célula diana) por PBL humanos (células efectoras) que no se transdujeron (UnTd) (■) o se transdujeron con vectores que codifican para GFP (●), SEQ ID NO: 10 (CAR de h139Ab-hCD828BBZ) (x) o SEQ ID NO: 11 (h139Ab-hCD28Z) (▲) a diversas razones de efector con respecto a diana (razón E:T).

La figura 2A es un gráfico que muestra la lisis específica (porcentaje de lisis) de la línea celular de tumor de glioblastoma U251 original marcada con ⁵¹Cr (célula diana) por PBL humanos (células efectoras) que no se transdujeron (UnTd) (■) o se transdujeron con vectores que codifican para proteína fluorescente verde (GFP) (●), CAR anti-ERBB2 (◆), SEQ ID NO: 10 (CAR de h139Ab-hCD828BBZ) (x) o SEQ ID NO: 11 (h139Ab-hCD28Z) (▲) a diversas razones de efector con respecto a diana (razón E:T).

Figura 2B es un gráfico que muestra la lisis específica (porcentaje de lisis) de la línea celular de tumor de glioblastoma U251-GFP marcada con ^{51}Cr (que expresa GFP) (célula diana) por PBL humanos (células efectoras) que no se transdujeron (UnTd) (■) o se transdujeron con vectores que codifican para proteína fluorescente verde (GFP) (●), CAR anti-ERBB2 (◆), SEQ ID NO: 10 (CAR de h139Ab-hCD828BBZ) (x) o SEQ ID NO: 11 (h139Ab-hCD28Z) (▲) a diversas razones de efector con respecto a diana (razón E:T).

La figura 2C es un gráfico que muestra la lisis específica (porcentaje de lisis) de la línea celular de tumor de glioblastoma U251-EGFR marcada con ^{51}Cr (que expresa EGFR silvestre) (célula diana) por PBL humanos (células efectoras) que no se transdujeron (UnTd) (■) o se transdujeron con vectores que codifican para proteína fluorescente verde (GFP) (●), CAR anti-ERBB2 (◆), SEQ ID NO: 10 (CAR de h139Ab-hCD828BBZ) (x) o SEQ ID NO: 11 (h139Ab-hCD28Z) (▲) a diversas razones de efector con respecto a diana (razón E:T).

La figura 2D es un gráfico que muestra la lisis específica (porcentaje de lisis) de la línea celular de tumor de glioblastoma U251-vIII marcada con ^{51}Cr (que expresa EGFRvIII silvestre) (célula diana) por PBL humanos (células efectoras) que no se transdujeron (UnTd) (■) o se transdujeron con vectores que codifican para proteína fluorescente verde (GFP) (●), CAR anti-ERBB2 (◆), SEQ ID NO: 10 (CAR de h139Ab-hCD828BBZ) (x) o SEQ ID NO: 11 (h139Ab-hCD28Z) (▲) a diversas razones de efector con respecto a diana (razón E:T).

Las figuras 3A-3C son gráficos que muestran la secreción de interferón (IFN)- γ tal como se mide mediante ELISA (pg/ml, media de determinaciones por triplicado) por células no transducidas (UT) o células T humanas transducidas con CAR de 3C10 (figura 3A), CAR de L8A4 (figura 3B), CAR de h139Ab-hCD28Z (figura 3C) tras el cocultivo con líneas celulares diana NIH-3T3 no transducida (3T3) (3T3 UT barras grises), BHK no transducida (BHK UT, barras de puntos), 293GP no transducida (293GP UT, barras a cuadros), 3T3 transducida con EGFR silvestre (3T3 EGFRwt, barras blancas), BHK transducida con EGFR silvestre (BHK EGFRwt, barras a rayas), 3T3 transducida con EGFRvIII (3T3 EGFRvIII, barras negras), BHK transducida con EGFRvIII (BHK EGFRvIII, barras rayadas en cruz) o 293GP transducidas con EGFRvIII (293GP EGFRvIII, barras con listas verticales y horizontales).

Las figuras 4A y 4B son gráficos que muestran la secreción de IFN- γ tal como se mide mediante ELISA (pg/ml, media de determinaciones por triplicado) por células T del donante 2 (figura 4A) o donante 3 (figura 4B) que se transdujeron con proteína fluorescente verde (GFP) o el vector 139-28Z (no clasificado) (139bulk), o células T que se transdujeron con el vector h139Ab-hCD28Z y luego se clasificaron con perlas en poblaciones de células T enriquecidas en CD8 y CD4 (>96%+) (139CD8+ y 139CD4+). Se midió IFN- γ tras el cocultivo de las células transducidas durante toda la noche con células diana BHK (barras negras), células BHK modificadas con ingeniería genética con EGFR silvestre (EGFRwt, barras grises) o células BHK modificadas por ingeniería genética con EGFRvIII (EGFRvIII, barras rayadas en cruz) o medio (barras a cuadros).

Las figuras 5A y 5B son gráficos que muestran la secreción de IFN- γ por células T del donante 4 humano (figura 5A) y el donante 5 humano (figura 5B) que no se transdujeron (UT) o se transdujeron con vector de CAR anti-EGFRvIII (139-28BBZ) (EGFRvIII), un vector que expresa GFP (GFP) o un vector de CAR que selecciona como diana ERBB2. Las células T transducidas se cocultivaron con medio (barras negras), células U251 modificadas por ingeniería genética con EGFR silvestre (U251-EGFRwt, barras blancas), células U251 modificadas por ingeniería genética con EGFR variante III (U251-EGFRvIII, barras grises) o líneas de células madre de glioma 1228 (barras con líneas horizontales), 308 (barras de puntos) o 822 (barras rayadas en cruz).

Descripción detallada de la invención

Una realización de la invención proporciona receptores de antígenos quiméricos (CAR) que comprenden un dominio de unión a antígeno de anticuerpo 139 humano (h139Ab), un dominio bisagra extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización de células T intracelular.

Un receptor de antígeno quimérico (CAR) es una proteína o polipéptido híbrido construido artificialmente que contiene el dominio de unión a antígenos de un anticuerpo (por ejemplo, scFv) unido a dominios de señalización de células T. Las características de los CAR incluyen su capacidad para redirigir la especificidad y reactividad de células T hacia una diana seleccionada de una manera no restringida por el CMH, aprovechando las propiedades de unión a antígeno de los anticuerpos monoclonales. El reconocimiento de antígenos no restringido por el CMH proporciona a las células T que expresan CAR la capacidad para reconocer un antígeno independientemente del procesamiento del antígeno, sorteando así un mecanismo principal de escape tumoral. Además, cuando se expresan en células T, los CAR ventajosamente no se dimerizan con las cadenas alfa y beta de receptores de células T endógenos (TCR).

Las frases "tienen especificidad de antígeno" y "provocan una respuesta específica de antígeno" tal como se usan en el presente documento significan que el CAR puede unirse específicamente a y reconocer inmunológicamente un antígeno, de manera que la unión del CAR al antígeno provoca una respuesta inmunitaria.

Los CAR de la invención tienen especificidad de antígeno para la variante III de receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII). EGFRvIII es una variante del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que es una glicoproteína transmembrana que es un miembro de la superfamilia de proteína cinasa. EGFRvIII es la más

5 prevalente de varias mutaciones de EGFR encontradas en gliomas humanos, y se expresa en de aproximadamente el 30% al aproximadamente 50% de los glioblastomas multiformes (GBM) (también conocidos como "glioblastoma"). La expresión de EGFRvIII resulta de transposiciones por delección intragénica que eliminan los exones 2-7 de EGFR, y provocan la unión de los exones 1 y 8 de las secuencias codificantes. EGFRvIII se expresa por células tumorales de diversos cánceres tales como, por ejemplo, glioblastoma (incluyendo células madre de glioblastoma); carcinomas de mama, ovario y de pulmón de células no pequeñas; carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; meduloblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de próstata y carcinoma de vejiga. Sin querer restringirse a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que provocando una respuesta específica de antígeno contra EGFRvIII, los CAR de la invención proporcionan uno o más de los siguientes: selección como diana y destrucción de células tumorales que expresan EGFRvIII, reducción o eliminación de tumores, facilitación de la infiltración de células inmunitarias en el sitio del tumor y potenciación/extensión de respuestas antitumorales. Debido a que EGFRvIII no se expresa en tejido normal (es decir, no canceroso), se contempla que los CAR de la invención evitan de manera sustancialmente ventajosa la selección como diana/destrucción de tejidos y células normales.

15 La invención proporciona un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno de anticuerpo 139 humano. El anticuerpo 139 es un anticuerpo humano, anti-EGFRvIII. El anticuerpo 139 se une específicamente a EGFRvIII. Se dan a conocer secuencias de anticuerpo 139 humano adecuadas en, por ejemplo, la patente estadounidense 7.628.986. En este sentido, una realización preferida de la invención proporciona CAR que comprenden un dominio de unión a antígeno que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en, un fragmento variable de cadena sencilla (single chain variable fragment, scFv) de anticuerpo 139 humano.

20 El anticuerpo 139 humano comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada. La región variable de cadena ligera puede comprender, consistir en o consistir esencialmente en SEQ ID NO: 1. La región variable de cadena pesada puede comprender, consistir o consistir esencialmente en SEQ ID NO: 2. Por consiguiente, en una realización de la invención, el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 1 y/o una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 2.

25 En una realización, el dominio de unión a antígeno comprende un péptido ligador. El péptido ligador puede estar situado entre la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada. En este sentido, el dominio de unión a antígeno puede comprender un péptido ligador que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 3.

30 En una realización, el dominio de unión a antígeno comprende una secuencia líder. La secuencia líder puede estar situada en el extremo amino terminal de la región variable de cadena ligera. En este sentido, el dominio de unión a antígeno puede comprender una secuencia líder que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 4.

35 En una realización, el dominio de unión a antígeno puede comprender una secuencia líder, una región variable de cadena ligera, un péptido ligador y una región variable de cadena pesada. En este sentido, el dominio de unión a antígeno que comprende una secuencia líder, una región variable de cadena ligera, un péptido ligador y una región variable de cadena pesada comprende, consiste en o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 5 (scFv de anticuerpo 139 humano).

40 En una realización de la invención, el CAR comprende un dominio bisagra extracelular, un dominio transmembrana y, opcionalmente, un dominio bisagra intracelular que comprende CD8 y un dominio de señalización de células T intracelular que comprende CD28, 4-1BB y CD3 ζ . CD28 es un marcador de células T importante en la coestimulación de células T. CD8 es también un marcador de células T. 4-1BB transmite una señal coestimuladora potente a las células T, promoviendo la diferenciación y potenciando la supervivencia a largo plazo de linfocitos T. CD3 ζ se asocia con TCR para producir una señal y contiene motivos de activación basados en tirosinas inmunorreceptoras (ITAM). En este sentido, una realización preferida de la invención proporciona un dominio bisagra extracelular y dominio transmembrana que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en, SEQ ID NO: 6 (dominio bisagra extracelular y dominio transmembrana de CD8 humano). El dominio de señalización de células T intracelular comprende, consiste esencialmente en o consiste en, SEQ ID NO: 7 (dominios de señalización de células T intracelulares de CD28, 4-1BB y CD3 ζ humanos).

50 En otra realización de la invención, el CAR comprende un dominio bisagra extracelular, dominio transmembrana y dominio de señalización de células T intracelular que comprende CD28 y CD3 ζ . En este sentido, una realización preferida de la invención proporciona un dominio bisagra extracelular, dominio transmembrana y dominio de señalización de células T intracelular que comprenden, que consisten esencialmente en o que consiste en, SEQ ID NO: 8 (dominio bisagra extracelular, transmembrana y dominios de señalización de células T intracelulares de CD28 humano) y SEQ ID NO: 9 (dominio de señalización de células T intracelular de CD3 ζ humano).

55 Realizaciones adicionales de la invención proporcionan CAR que comprenden o que consisten en cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en la tabla 1.

TABLA 1

Secuencia	scFv	Componentes adicionales
SEQ ID NO: 10 (h139Ab-hCD828BBZ)	anticuerpo 139 humano	- Dominios bisagra extracelular y transmembrana de CD8 humano - Dominios de señalización de células T intracelulares de CD28 humano, 4-1BB humano y CD3ζ humano
SEQ ID NO: 11 (h139Ab-hCD28Z)	anticuerpo 139 humano	- Dominios bisagra extracelular y transmembrana de CD8 humano - Dominios de señalización de células T intracelulares de CD28 humano y CD3ζ humano

La invención también proporciona ácidos nucleicos relacionados, vectores de expresión recombinante, células huésped, poblaciones de células y composiciones farmacéuticas que codifican para los CAR de la invención.

5 Se incluyen en la divulgación porciones de los CAR de la invención descritos en el presente documento. El término "porción funcional" cuando se usa en referencia a un CAR se refiere a cualquier parte o fragmento del CAR de la invención, parte o fragmento que conserva la actividad biológica del CAR del que es parte (el CAR original). Las porciones funcionales abarcan, por ejemplo, las partes de un CAR que conservan la capacidad para reconocer células diana, o detectar, tratar o prevenir una enfermedad, en un grado similar, el mismo grado o en un mayor grado, que el CAR original. En referencia al CAR original, la porción funcional puede comprender, por ejemplo, 10 aproximadamente el 10%, el 25%, el 30%, el 50%, el 68%, el 80%, el 90%, el 95% o más, del CAR original.

La porción funcional puede comprender aminoácidos adicionales en el extremo amino o carboxilo terminal de la porción, o en ambos extremos terminales, aminoácidos adicionales que no se encuentran en la secuencia de aminoácidos del CAR original. Deseablemente, los aminoácidos adicionales no interfieren con la función biológica de la porción funcional, por ejemplo, reconocer células diana, detectar cáncer, tratar o prevenir el cáncer, etc. Más 15 deseablemente, los aminoácidos adicionales potencian la actividad biológica, en comparación con la actividad biológica del CAR original.

Se incluyen en la divulgación variantes funcionales de los CAR de la invención descritos en el presente documento. El término "variante funcional" tal como se usa en el presente documento se refiere a un CAR, polipéptido o proteína que tiene similitud o identidad de secuencia sustancial o significativa con un CAR original, variante funcional que 20 conserva la actividad biológica del CAR del que es una variante. Las variantes funcionales abarcan, por ejemplo, las variantes del CAR descrito en el presente documento (el CAR original) que conservan la capacidad para reconocer células diana en un grado similar, el mismo grado o en un mayor grado que el CAR original. En referencia al CAR original, la variante funcional puede ser, por ejemplo, al menos aproximadamente el 30%, el 50%, el 75%, el 80%, el 90%, el 98% o más idéntica en secuencia de aminoácidos al CAR original.

25 Una variante funcional puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del CAR original con al menos una sustitución de aminoácido conservativa. Alternativa o adicionalmente, las variantes funcionales pueden comprender la secuencia de aminoácidos del CAR original con al menos una sustitución de aminoácido no conservativa. En este caso, es preferible que la sustitución de aminoácido no conservativa no interfiera con ni inhiba la actividad biológica de la variante funcional. La sustitución de aminoácido no conservativa puede potenciar la 30 actividad biológica de la variante funcional, de manera que la actividad biológica de la variante funcional aumenta en comparación con el CAR original.

Sustituciones de aminoácidos de los CAR de la invención son preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservativas. Se conocen en la técnica sustituciones de aminoácidos conservativas, e incluyen sustituciones de 35 aminoácidos en las que un aminoácido que tiene determinadas propiedades físicas y/o químicas se intercambia por otro aminoácido que tiene las mismas o similares propiedades químicas o físicas. Por ejemplo, la sustitución de aminoácido conservativa puede ser un aminoácido polar ácido/cargado negativamente sustituido por otro aminoácido polar ácido/cargado negativamente (por ejemplo, Asp o Glu), un aminoácido con una cadena lateral apolar sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral apolar (por ejemplo, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Cys, Val, etc.), un aminoácido polar básico/cargado positivamente sustituido por otro aminoácido polar 40 básico/cargado positivamente (por ejemplo Lys, His, Arg, etc.), un aminoácido no cargado con una cadena lateral polar sustituido por otro aminoácido no cargado con una cadena lateral polar (por ejemplo, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr, etc.), un aminoácido con una cadena lateral ramificada en beta sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral ramificada en beta (por ejemplo, Ile, Thr y Val), un aminoácido con una cadena lateral aromática sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral aromática (por ejemplo, His, Phe, Trp y Tyr), etc.

45 El CAR puede consistir esencialmente en la secuencia o secuencias de aminoácidos especificadas descritas en el presente documento, de manera que otros componentes, por ejemplo, otros aminoácidos, no cambian materialmente la actividad biológica de la variante funcional.

Los CAR de realizaciones de la invención (y porciones funcionales y variantes funcionales de la divulgación) pueden ser de cualquier longitud, es decir, pueden comprender cualquier número de aminoácidos, siempre que los CAR (o 50 porciones funcionales o variantes funcionales de los mismos) conserven su actividad biológica, por ejemplo, la capacidad para unirse específicamente al antígeno, detectar células enfermas en un huésped o tratar o prevenir una

enfermedad en un huésped, etc. Por ejemplo, el CAR puede tener de aproximadamente 50 a aproximadamente 5000 aminoácidos de largo, tal como 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 ó más aminoácidos de longitud.

5 Los CAR de realizaciones de la invención (y porciones funcionales y variantes funcionales de la divulgación) pueden comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos que se producen de manera natural. Tales aminoácidos sintéticos se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, ácido aminociclohexanocarboxílico, norleucina, ácido α -amino-n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometil-cisteína, trans-3- y trans-4-hidroxi prolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina, β -fenilserina β -hidroxifenilalanina, fenilglicina, α -naftilalanina, ciclohexilalanina, ciclohexilglicina, ácido indolin-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-
10 tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, ácido aminomalónico, monoamida de ácido aminomalónico, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, ornitina, ácido α -aminociclopentanocarboxílico, ácido α -aminociclohexanocarboxílico, ácido α -aminocicloheptanocarboxílico, ácido α -(2-amino-2-norbornano)-carboxílico, ácido α,γ -diaminobutírico, ácido α,β,γ -diaminopropiónico, homofenilalanina y α -terc-butilglicina.

15 Los CAR de realizaciones de la invención (y porciones funcionales y variantes funcionales de la divulgación) pueden glicosilarse, amidarse, carboxilarse, fosforilarse, esterificarse, N-acilarse, ciclarse por medio de, por ejemplo, un puente disulfuro, o convertirse en una sal de adición de ácido y/o opcionalmente dimerizarse o polimerizarse, o conjugarse.

20 Los CAR de realizaciones de la invención (y porciones funcionales y variantes funcionales de la divulgación) pueden obtenerse mediante métodos conocidos en la técnica. Los CAR pueden prepararse mediante cualquier método adecuado de preparación de polipéptidos o proteínas. Se describen métodos adecuados de síntesis *de novo* de polipéptidos y proteínas en referencias tales como Chan *et al.*, Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2000; Peptide and Protein Drug Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood *et al.*, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2001; y la patente estadounidense 5.449.752. Además, pueden producirse de manera recombinante polipéptidos y proteínas usando
25 los ácidos nucleicos descritos en el presente documento usando métodos recombinantes convencionales. Véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, NY, 1994. Además, algunos de los CAR de la invención (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de la divulgación) pueden aislarse y/o purificarse de una fuente, tal como una planta, una
30 bacteria, un insecto, un mamífero, por ejemplo, una rata, un ser humano, etc. Se conocen bien en la técnica métodos de aislamiento y purificación. Alternativamente, los CAR descritos en el presente documento (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos) pueden sintetizarse comercialmente en empresas, tales como Synpep (Dublin, CA), Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD), y Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). En este sentido, los CAR de la invención pueden ser sintéticos, recombinantes, aislados y/o purificados.

35 Una realización de la divulgación proporciona además un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo de los CAR de la invención. El anticuerpo puede ser cualquier tipo de inmunoglobulina que se conoce en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser de cualquier isotipo, por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, etc. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo que se produce de manera natural, por ejemplo, un anticuerpo aislado y/o purificado a partir de un mamífero, por
40 ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, pollo, hámster, ser humano, etc. Alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo modificado por ingeniería genética, por ejemplo, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. El anticuerpo puede estar en forma monomérica o polimérica. Además, el anticuerpo puede tener cualquier nivel de afinidad o avidez por la porción funcional del CAR de la invención.

45 Se conocen en la técnica métodos para someter a prueba anticuerpos para determinar la capacidad de unirse a cualquier porción funcional del CAR de la invención e incluyen cualquier ensayo de unión de anticuerpo-antígeno, tal como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ELISA, inmunotransferencia de tipo Western, inmunoprecipitación y ensayos de inhibición de competición (véanse, por ejemplo, Janeway *et al.*, citado a continuación, y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2002/0197266 A1).

50 Se conocen en la técnica métodos adecuados de preparación de anticuerpos. Por ejemplo, se describen métodos de hibridoma convencionales en, por ejemplo, Köhler y Milstein, Eur. J. Immunol., 5, 511-519 (1976), Harlow and Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988), y C.A. Janeway *et al.* (eds.), Immunobiology, 5ª ed., Garland Publishing, Nueva York, NY (2001)). Alternativamente, se conocen en la técnica otros métodos, tales como métodos de hibridoma de VEB (Haskard y Archer, J. Immunol. Methods, 74(2), 361-67 (1984), y Roder *et al.*,
55 Methods Enzymol., 121, 140-67 (1986)), y sistemas de expresión de vectores de bacteriófagos (véase, por ejemplo, Huse *et al.*, Science, 246, 1275-81 (1989)). Además, se describen métodos de producción de anticuerpos en animales no humanos en, por ejemplo, las patentes estadounidenses 5.545.806, 5.569.825 y 5.714.352, y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2002/0197266 A1).

60 Puede usarse además presentación en fago para generar un anticuerpo. En este sentido, pueden generarse bibliotecas de fagos que codifican para dominios variables (V) de unión a antígeno de anticuerpos usando técnicas de ADN recombinante y biología molecular convencionales (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado

anteriormente, y Ausubel *et al.*, citado anteriormente). Se seleccionan fagos que codifican para una región variable con la especificidad deseada para la unión específica al antígeno deseado, y se reconstituye un anticuerpo completo o parcial que comprende el dominio variable seleccionado. Se introducen secuencias de ácidos nucleicos que codifican para el anticuerpo reconstituido en una línea celular adecuada, tal como una célula de mieloma usada para la producción de hibridomas, de manera que la célula secreta anticuerpos que tienen las características de anticuerpos monoclonales (véanse, por ejemplo, Janeway *et al.*, citado anteriormente, Huse *et al.*, citado anteriormente y la patente estadounidense 6.265.150).

Pueden producirse anticuerpos mediante ratones transgénicos que son transgénicos para genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera específicos. Tales métodos se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo las patentes estadounidenses 5.545.806 y 5.569.825, y Janeway *et al.*, citado anteriormente.

Se conocen bien en la técnica métodos para generar anticuerpos humanizados y se describen en detalle en, por ejemplo, Janeway *et al.*, citado anteriormente, las patentes estadounidenses 5.225.539, 5.585.089 y 5.693.761, la patente europea n.º 0239400 B1 y la patente del Reino Unido n.º 2188638. También pueden generarse anticuerpos humanizados usando la tecnología de remodelación de la superficie de anticuerpos descrita en la patente estadounidense 5.639.641 y Pedersen *et al.*, J. Mol. Biol., 235, 959-973 (1994).

Una realización de la divulgación también proporciona porciones de unión a antígeno de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. La porción de unión a antígeno puede ser cualquier porción que tiene al menos un sitio de unión a antígeno, tal como Fab, F(ab')₂, dsFv, sFv, diacuerpos y triacuerpos.

Un fragmento de anticuerpo de fragmento de región variable de cadena sencilla (sFv), que es un fragmento Fab truncado que incluye el dominio variable (V) de una cadena pesada de anticuerpo unido a un dominio V de una cadena ligera de anticuerpo por medio de un péptido sintético, puede generarse usando técnicas de tecnología de ADN recombinante de rutina (véase, por ejemplo, Janeway *et al.*, citado anteriormente). De manera similar, pueden prepararse fragmentos de región variable estabilizados por disulfuro (dsFv) mediante tecnología de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Reiter *et al.*, Protein Engineering, 7, 697-704 (1994)). Sin embargo, los fragmentos de anticuerpo de la invención no se limitan a estos tipos a modo de ejemplo de fragmentos de anticuerpo.

Además, el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, puede modificarse para que comprenda un marcador detectable, tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa del rábano) y partículas elementales (por ejemplo, partículas de oro).

Además una realización de la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para cualquiera de los CAR descritos en el presente documento (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos). Una realización de la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio de unión a antígeno de anticuerpo 139 humano que comprende SEQ ID NO: 12 (que codifica para la secuencia líder, la región variable de cadena ligera de anticuerpo 139 humano, el péptido ligador y la región variable de cadena pesada de anticuerpo 139 humano). En este sentido, una realización de la invención proporciona ácidos nucleicos que comprenden o que consisten en las secuencias de nucleótidos de la tabla 2:

TABLA 2

Secuencia	scFv	Componentes adicionales
SEQ ID NO: 13 (h139Ab-hCD828BBZ)	anticuerpo 139 humano	- Dominios bisagra extracelular y transmembrana de CD8 humano - Dominios de señalización de células T intracelulares de CD28 humano, 4-1BB humano y CD3ζ humano
SEQ ID NO: 14 (h139Ab-hCD28Z)	anticuerpo 139 humano	- Dominios bisagra extracelular y transmembrana de CD8 humano - Dominios de señalización de células T intracelulares de CD28 humano y CD3ζ humano

“Ácido nucleico” tal como se usa en el presente documento incluye “polinucleótido”, “oligonucleótido” y “molécula de ácido nucleico”, y generalmente significa un polímero de ADN o ARN, que puede ser monocatenario o bicatenario, sintetizado u obtenido (por ejemplo, aislado y/o purificado) a partir de fuentes naturales, que puede contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, y que puede contener una unión internucleotídica natural, no natural o alterada, tal como una unión fosforoamidato o una unión fosforotioato, en lugar del fosfodiéster encontrado entre los nucleótidos de un oligonucleótido no modificado. En algunas realizaciones, el ácido nucleico no comprende ninguna inserción, delección, inversión y/o sustitución. Sin embargo, puede ser adecuado en algunos casos, tal como se comenta en el presente documento, que el ácido nucleico comprenda una o más inserciones, delecciones, inversiones y/o sustituciones.

Los ácidos nucleicos de una realización de la invención pueden ser recombinantes. Tal como se usa en el presente documento, el término "recombinante" se refiere a (i) moléculas que se construyen fuera de células vivas uniendo segmentos de ácido nucleico naturales o sintéticos a moléculas de ácido nucleico que pueden replicarse en una célula viva, o (ii) moléculas que resultan de la replicación de las descritas en (i) anteriormente. Para los fines en el presente documento, la replicación puede ser replicación *in vitro* o replicación *in vivo*.

Un ácido nucleico recombinante puede ser uno que tiene una secuencia que no se produce de manera natural o que tiene una secuencia que se produce mediante una combinación artificial de dos segmentos de secuencia por lo demás diferenciados. Esta combinación artificial se logra a menudo mediante síntesis química o, más comúnmente, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética, tales como las descritas en Sambrook *et al.*, citado anteriormente. Los ácidos nucleicos pueden construirse basándose en reacciones de síntesis química y/o ligación enzimática usando procedimientos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado anteriormente, y Ausubel *et al.*, citado anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico puede sintetizarse químicamente usando nucleótidos que se producen de manera natural o nucleótidos modificados de manera diversa diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado tras la hibridación (por ejemplo, derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina). Los ejemplos de nucleótidos modificados que pueden usarse para generar los ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, adenina N⁶-sustituida, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, uno o más de los ácidos nucleicos de la invención pueden adquirirse de empresas tales como Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) y Synthegen (Houston, TX).

El ácido nucleico descrito en el presente documento puede comprender cualquier secuencia de nucleótidos aislada o purificada que codifica para cualquiera de los CAR o porciones funcionales o variantes funcionales de los mismos. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos puede comprender una secuencia de nucleótidos que está degenerada con respecto a cualquiera de las secuencias o una combinación de secuencias degeneradas.

Un aspecto de la divulgación proporciona además un ácido nucleico aislado o purificado que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento o una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento.

La secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas puede hibridarse en condiciones de alta rigurosidad. Por "condiciones de alta rigurosidad" quiere decirse que la secuencia de nucleótidos se hibrida específicamente con una secuencia diana (la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento) en una cantidad que es más fuerte de manera detectable que la hibridación no específica. Las condiciones de alta rigurosidad incluyen condiciones que distinguirían un polinucleótido con una secuencia complementaria exacta, o una que contiene sólo unos cuantos apareamientos erróneos dispersos, de una secuencia al azar que ocurrió que tenía unas cuantas regiones pequeñas (por ejemplo, 3-10 bases) que coincidían con la secuencia de nucleótidos. Tales regiones pequeñas de complementariedad se funden más fácilmente que un complemento de longitud completa de 14-17 o más bases, y la hibridación de alta rigurosidad las hace más fácilmente distinguibles. Las condiciones de rigurosidad relativamente alta incluirían, por ejemplo, condiciones de bajo contenido en sal y/o alta temperatura, tal como se proporcionan por NaCl aproximadamente 0,02-0,1 M o el equivalente, a temperaturas de aproximadamente 50-70°C. Tales condiciones de alta rigurosidad toleran pocos, si es que alguno, apareamientos erróneos entre la secuencia de nucleótidos y la hebra diana o molde, y son particularmente adecuadas para detectar la expresión de cualquiera de los CAR de la invención. Se aprecia generalmente que las condiciones pueden hacerse más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida.

La divulgación también proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente el 70% o más, por ejemplo, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98% o aproximadamente el 99% idéntica a cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento.

En una realización, los ácidos nucleicos de la invención pueden incorporarse en un vector de expresión recombinante. En este sentido, una realización de la invención proporciona vectores de expresión recombinante que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos de la invención. Para los fines en el presente documento, el término "vector de expresión recombinante" significa un constructo de oligonucleótido o polinucleótido modificado genéticamente que permite la expresión de un ARNm, proteína, polipéptido o péptido por una célula huésped, cuando el constructo comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el ARNm, proteína, polipéptido o

- péptido, y el vector se pone en contacto con la célula en condiciones suficientes para hacer que el ARNm, proteína, polipéptido o péptido se exprese dentro de la célula. Los vectores de la invención no se producen de manera natural en su totalidad. Sin embargo, partes de los vectores pueden producirse de manera natural. Los vectores de expresión recombinante de la invención pueden comprender cualquier tipo de nucleótidos, incluyendo, pero sin limitarse a ADN y ARN, que pueden ser monocatenarios o bicatenarios, sintetizados u obtenidos en parte a partir de fuentes naturales, y que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados. Los vectores de expresión recombinante pueden comprender uniones internucleotídicas que se producen de manera natural o que no se producen de manera natural, o ambos tipos de uniones. Preferiblemente, las uniones internucleotídicas o nucleótidos alterados o que no se producen de manera natural no dificultan la transcripción o replicación del vector.
- En una realización, el vector de expresión recombinante de la invención puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado, y puede usarse para transformar o transfectar cualquier huésped adecuado. Los vectores adecuados incluyen los diseñados para la propagación y expansión o para la expresión o ambos, tales como plásmidos y virus. El vector puede seleccionarse del grupo que consiste en la serie pUC (Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, MD), la serie pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA), la serie pET (Novagen, Madison, WI), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y la serie pEX (Clontech, Palo Alto, CA). También pueden usarse vectores de bacteriófagos, tales como λ GT10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 y λ NM1149. Los ejemplos de vectores de expresión de plantas incluyen pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). Los ejemplos de vectores de expresión de animales incluyen pEUK-CI, pMAM y pMAMneo (Clontech). El vector de expresión recombinante puede ser un vector viral, por ejemplo, un vector retroviral.
- Se conocen generalmente en la técnicas varias técnicas de transfección (véanse, por ejemplo, Graham *et al.*, Virology, 52: 456-467 (1973); Sambrook *et al.*, citado anteriormente; Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier (1986); y Chu *et al.*, Gene, 13: 97 (1981). Los métodos de transfección incluyen coprecipitación con fosfato de calcio (véase, por ejemplo, Graham *et al.*, citado anteriormente), microinyección directa en células cultivadas (véase, por ejemplo, Capecchi, Cell, 22: 479-488 (1980)), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa *et al.*, BioTechniques, 6: 742-751 (1988)), transferencia génica mediada por liposomas (véase, por ejemplo, Mannino *et al.*, BioTechniques, 6: 682-690 (1988)), transducción mediada por lípidos (véase, por ejemplo, Felgner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7413-7417 (1987)) y administración de ácido nucleico usando microproyectiles de alta velocidad (véase, por ejemplo, Klein *et al.*, Nature, 327: 70-73 (1987)).
- En una realización, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden prepararse usando técnicas de ADN recombinante convencionales descritas en, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado anteriormente, y Ausubel *et al.*, citado anteriormente. Pueden prepararse constructos de vectores de expresión, que son circulares o lineales, para que contengan un sistema de replicación funcional en una célula huésped procarionota o eucariota. Los sistemas de replicación pueden derivarse, por ejemplo, del plásmido ColEI, plásmido 2 μ , λ , SV40, virus del papiloma bovino, y similares.
- El vector de expresión recombinante puede comprender secuencias reguladoras, tales como codones de inicio y terminación de la transcripción y traducción, que son específicos para el tipo de huésped (por ejemplo, bacteria, hongo, planta o animal) en el que va a introducirse el vector, según sea apropiado, y teniendo en consideración si el vector está basado en ADN o ARN.
- El vector de expresión recombinante puede incluir uno o más genes marcadores, que permiten la selección de huéspedes transformados o transfectados. Los genes marcadores incluyen resistencia a biocidas, por ejemplo, resistencia a antibióticos, metales pesados, etc., complementación en un huésped auxotrófico para proporcionar prototrofia, y similares. Los genes marcadores adecuados para los vectores de expresión de la invención incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a neomicina/G418, genes de resistencia a higromicina, genes de resistencia a histidinol, genes de resistencia a tetraciclina y genes de resistencia a ampicilina.
- El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor nativo o no nativo operativamente unido a la secuencia de nucleótidos que codifica para el CAR (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales del mismo), o a la secuencia de nucleótidos que es complementaria a o que se hibrida con la secuencia de nucleótidos que codifica para el CAR. La selección de promotores, por ejemplo, fuertes, débiles, inducibles, específicos de tejido y específicos de desarrollo, está dentro de la experiencia habitual del experto. De manera similar, la combinación de una secuencia de nucleótidos con un promotor está también dentro de la experiencia del experto. El promotor puede ser un promotor no viral o un promotor viral, por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de SV40, un promotor de VRS o un promotor encontrado en la repetición terminal larga del virus de células madre murinas.
- Los vectores de expresión recombinante de la invención pueden estar diseñados para o bien expresión transitoria, para expresión estable o bien para ambas. Además, los vectores de expresión recombinante pueden estar hechos para expresión constitutiva o para expresión inducible.
- Además, puede hacerse que los vectores de expresión recombinante incluyan un gen suicida. Tal como se usa en el presente documento, el término "gen suicida" se refiere a un gen que provoca que la célula que expresa el gen suicida muera. El gen suicida puede ser un gen que confiere sensibilidad a un agente, por ejemplo, un fármaco, en

la célula en la que se expresa el gen, y provoca que la célula muera cuando la célula se pone en contacto con o se expone al agente. Se conocen en la técnica genes suicidas (véase, por ejemplo, *Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews*, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, RU), Humana Press, 2004) e incluyen, por ejemplo, el gen de timidina cinasa (TK) del virus del herpes simple (VHS), citosina desaminasa, nucleósido de purina fosforilasa y nitrorreductasa.

Se incluyen en el alcance de la invención conjugados, por ejemplo, bioconjugados, que comprenden cualquiera de los CAR de la invención, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, células huésped, poblaciones de células huésped o anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos. Se conocen en la técnica conjugados, así como métodos de síntesis de conjugados en general (véase, por ejemplo, Hudecz, F., *Methods Mol. Biol.* 298: 209-223 (2005) y Kirin *et al.*, *Inorg Chem.* 44(15): 5405-5415 (2005)).

Una realización de la invención proporciona además una célula huésped que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinante de la invención descritos en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, el término "célula huésped" se refiere a cualquier tipo de célula que pueda contener el vector de expresión recombinante de la invención. La célula huésped puede ser una célula eucariota, por ejemplo, planta, animal, hongos o algas, o puede ser una célula procariota, por ejemplo, bacterias o protozoos. La célula huésped puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente de un organismo, por ejemplo, un ser humano. La célula huésped puede ser una célula adherente o una célula suspendida, es decir, una célula que crece en suspensión. Se conocen en la técnica células huésped adecuadas e incluyen, por ejemplo, células de *E. coli* DH5 α , células de ovario de hámster chino, células VERO de mono, células COS, células HEK293, y similares. Para los fines de amplificar o replicar el vector de expresión recombinante, la célula huésped puede ser una célula procariota, por ejemplo, una célula DH5 α . Para los fines de producir un CAR recombinante, la célula huésped puede ser una célula de mamífero. La célula huésped puede ser una célula humana. Aunque la célula huésped puede ser de cualquier tipo de célula, puede originarse a partir de cualquier tipo de tejido y puede estar en cualquier fase del desarrollo, la célula huésped puede ser un linfocito de sangre periférica (PBL) o una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC). La célula huésped puede ser una célula T.

Para los fines en el presente documento, la célula T puede ser cualquier célula T, tal como una célula T cultivada, por ejemplo, una célula T primaria o una célula T a partir de una línea de células T cultivada, por ejemplo, Jurkat, SupT1, etc., o una célula T obtenida de un mamífero. Si se obtiene de un mamífero, la célula T puede obtenerse a partir de numerosas fuentes, incluyendo pero sin limitarse a sangre, médula ósea, ganglio linfático, el timo u otros tejidos o fluidos. Las células T también pueden enriquecerse o purificarse. La célula T puede ser una célula T humana. La célula T puede ser una célula T aislada de un ser humano. La célula T puede ser cualquier tipo de célula T y puede estar en cualquier fase de desarrollo, incluyendo pero sin limitarse a, células T positivas dobles para CD4 $^+$ /CD8 $^+$, células T auxiliares CD4 $^+$, por ejemplo, células Th $_1$ y Th $_2$, células T CD8 $^+$ (por ejemplo, células T citotóxicas), células infiltrantes tumorales, células T de memoria, células T sin tratamiento previo, y similares. La célula T puede ser una célula T CD8 $^+$ o una célula T CD4 $^+$.

También proporciona una realización de la invención una población de células que comprende al menos una célula huésped de la invención descrita en el presente documento. La población de células puede ser una población heterogénea que comprende la célula huésped que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinante descritos, además de al menos otra célula, por ejemplo, una célula huésped (por ejemplo, una célula T), que no comprende ninguno de los vectores de expresión recombinante, o una célula distinta de una célula T, por ejemplo, una célula B, un macrófago, un neutrófilo, un eritrocito, un hepatocito, una célula endotelial, una célula epitelial, una célula muscular, una célula cerebral, etc. Alternativamente, la población de células puede ser una población sustancialmente homogénea, en la población comprende principalmente células huésped (por ejemplo, que consisten esencialmente en) que comprenden el vector de expresión recombinante. La población también puede ser una población de células clonal, en la que todas las células de la población son clones de una única célula huésped que comprende un vector de expresión recombinante, de manera que todas las células de la población comprenden el vector de expresión recombinante. En una realización de la invención, la población de células es una población clonal que comprende células huésped que comprenden un vector de expresión recombinante tal como se describe en el presente documento.

Los CAR, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante y células huésped (incluyendo poblaciones de las mismas), tal como se definen en las reivindicaciones, todos los cuales se denominan colectivamente "materiales de CAR de la invención" a continuación en el presente documento, pueden estar aislados y/o purificados. El término "aislado" tal como se usa en el presente documento significa que se ha retirado de su entorno natural. El término "purificado" o "aislado" no requiere aislamiento o pureza absoluta; más bien, está previsto como un término relativo. Por tanto, por ejemplo, una preparación de células huésped purificadas (o aisladas) es una en la que la célula huésped es más pura que las células en su entorno natural dentro del cuerpo. Tales células huésped pueden producirse, por ejemplo, mediante técnicas de purificación convencionales. En algunas realizaciones, una preparación de una célula huésped se purifica de manera que la célula huésped representa al menos aproximadamente el 50%, por ejemplo al menos aproximadamente el 70%, del contenido celular total de la preparación. Por ejemplo, la pureza puede ser de al menos aproximadamente el 50%, puede ser mayor de aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70% o aproximadamente el 80%, o puede ser de aproximadamente el 100%. El material de CAR de la invención se define en las reivindicaciones.

Los materiales de CAR de la invención pueden formularse para dar una composición, tal como una composición farmacéutica. En este sentido, una realización de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los CAR de la invención, ácidos nucleicos, vectores de expresión y células huésped (incluyendo poblaciones de las mismas), y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de la invención que contienen cualquiera de los materiales de CAR de la invención pueden comprender más de un material de CAR de la invención, por ejemplo, un CAR y un ácido nucleico, o dos o más CAR diferentes. Alternativamente, la composición farmacéutica puede comprender un material de CAR de la invención en combinación con otros fármacos o agentes farmacéuticamente activos, tales como agentes quimioterápicos, por ejemplo, asparaginasa, busulfano, carboplatino, cisplatino, daunorubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiaurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende la célula huésped de la invención o poblaciones de la misma.

Los materiales de CAR de la invención pueden proporcionarse en forma de una sal, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de ácidos minerales, tales como ácidos clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, nítrico y sulfúrico, y ácidos orgánicos, tales como ácidos tartárico, acético, cítrico, málico, láctico, fumárico, benzoico, glicólico, glucónico, succínico y arilsulfónico, por ejemplo, ácido p-toluenosulfónico.

Con respecto a composiciones farmacéuticas, el portador farmacéuticamente aceptable puede ser cualquiera de los usados convencionalmente y está limitado sólo por consideraciones fisicoquímicas, tales como solubilidad y falta de reactividad con el/los principio(s) activo(s), y por la vía de administración. Los portadores farmacéuticamente aceptables descritos en el presente documento, por ejemplo, vehículos, adyuvantes, excipientes y diluyentes, los conocen bien los expertos en la técnica y están fácilmente disponibles para el público. Se prefiere que el portador farmacéuticamente aceptable sea uno que sea químicamente inerte para el/los principio(s) activo(s) y uno que no tenga efectos secundarios perjudiciales o toxicidad en las condiciones de uso.

La elección del portador se determinará en parte por el material de CAR de la invención particular, así como por el método particular usado para administrar el material de CAR de la invención. Por consiguiente, hay una variedad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica de la invención. Pueden usarse conservantes. Los conservantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sodio y cloruro de benzalconio. Puede usarse una mezcla de dos o más conservantes opcionalmente. El conservante o mezclas del mismo están presentes normalmente en una cantidad de aproximadamente el 0,0001% a aproximadamente el 2% en peso de la composición total.

Los agentes tamponantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, ácido cítrico, citrato de sodio, ácido fosfórico, fosfato de potasio, y otros diversos ácidos y sales. Puede usarse una mezcla de dos o más agentes tamponantes opcionalmente. El agente tamponante o mezclas del mismo están presentes normalmente en una cantidad de aproximadamente el 0,001% a aproximadamente el 4% en peso de la composición total.

La concentración de material de CAR de la invención en las formulaciones farmacéuticas puede variar, por ejemplo, desde menos de aproximadamente el 1%, habitualmente a o al menos aproximadamente el 10%, hasta tanto como de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 50% o más en peso, y puede seleccionarse principalmente mediante los volúmenes de fluido, y las viscosidades, según el modo de administración particular seleccionado.

Los expertos en la técnica conocen métodos para preparar composiciones administrables (por ejemplo, administrables por vía parenteral), o les resultan evidentes, y se describen en más detalle en, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21ª ed. (1 de mayo de 2005).

Las siguientes formulaciones para administración oral, en aerosol, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intradérmica, interperitoneal e intratecal) y administración tópica son meramente a modo de ejemplo y no son de ningún modo limitativas. Puede usarse más de una vía para administrar los materiales de CAR de la invención, y en determinados casos, una vía particular puede proporcionar una respuesta más inmediata y más eficaz que otra vía.

Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden comprender o consistir en (a) disoluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz del material de CAR de la invención disuelto en diluyentes, tales como agua, solución salina o zumo de naranja; (b) cápsulas, sobres, comprimidos, pastillas para chupar y trociscos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del principio activo, como sólidos o gránulos; (c) polvos; (d) suspensiones en un líquido apropiado; y (e) emulsiones adecuadas. Las formulaciones líquidas pueden incluir diluyentes tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico y los alcoholes de polietileno, o bien con o bien sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable. Las formas de cápsula pueden ser del tipo de gelatina de vaina dura o blanda habitual que contiene, por ejemplo, tensioactivos, lubricantes y cargas inertes, tales como lactosa, sacarosa, fosfato de calcio y almidón de maíz. Las formas de comprimidos pueden incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, celulosa microcristalina, goma arábiga, gelatina, goma guar, dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa sódica, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de zinc, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes tamponantes, agentes disgregantes, agentes humectantes, conservantes, agentes saborizantes y otros excipientes farmacológicamente

compatibles. Las formas de pastilla para chupar pueden comprender el material de CAR de la invención en un sabor, habitualmente sacarosa y goma arábica o tragacanto, así como píldoras que comprenden el material de CAR de la invención en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica, emulsiones, geles, y similares que contienen, además, tales excipientes tal como se conocen en la técnica.

- 5 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones para inyección estériles isotónicas acuosas o no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. El material de CAR de la invención puede administrarse en un diluyente fisiológicamente aceptable en un portador farmacéutico, tal como un líquido estéril o mezcla de líquidos, incluyendo agua, solución salina, dextrosa acuosa y disoluciones de azúcares relacionados, un alcohol, tal como etanol o alcohol hexadecílico, un glicol, tal como propilenglicol o polietilenglicol, dimetilsulfóxido, glicerol, cetales tales como 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol, éteres, poli(etilenglicol) 400, aceites, ácidos grasos, glicéridos o ésteres de ácidos grasos, o glicéridos de ácidos grasos acetilados con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, tal como un jabón o un detergente, agente de suspensión, tal como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa, o agentes emulsionantes y otros adyuvantes farmacéuticos.

Los aceites que pueden usarse en formulaciones parenterales incluyen vaselina, aceites animales, vegetales o sintéticos. Los ejemplos específicos de aceites incluyen de cacahuete, soja, sésamo, semilla de algodón, maíz, oliva, vaselina y mineral. Los ácidos grasos adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico y ácido isoesteárico. Oleato de etilo y miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácidos grasos adecuados.

Los jabones adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen sales de metal alcalino graso, amonio y trietanolamina, y los detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos tales como, por ejemplo, haluros de dimetildialquilamonio y haluros de alquilpiridinio, (b) detergentes aniónicos tales como, por ejemplo, sulfonatos de alquilo, arilo y olefina, sulfatos de alquilo, olefina, éter y monoglicérido, y sulfosuccinatos, (c) detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, óxidos de amina grasa, alcanolamidas de ácidos grasos y copolímeros de polioxitilenopolipropileno, (d) detergentes anfóteros tales como, por ejemplo, alquil- β -aminopropionatos y sales de amonio cuaternario de 2-alquil-imidazolina, y (e) mezclas de los mismos.

Las formulaciones parenterales contendrán normalmente, por ejemplo, desde aproximadamente el 0,5% hasta aproximadamente el 25% en peso del material de CAR de la invención en disolución. Pueden usarse conservantes y tampones. Con el fin de minimizar o eliminar la irritación en el sitio de inyección, tales composiciones pueden contener uno o más tensioactivos no iónicos que tienen, por ejemplo, un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de desde aproximadamente 12 hasta aproximadamente 17. La cantidad de tensioactivo en tales formulaciones oscilará normalmente, por ejemplo, entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 15% en peso. Los tensioactivos adecuados incluyen ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol-sorbitano, tales como monooleato de sorbitano y los aductos de alto peso molecular de óxido de etileno con una base hidrófoba, formados por la condensación de óxido de propileno con propilenglicol. Las formulaciones parenterales pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitaria o de múltiples dosis, tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere sólo la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse disoluciones y suspensiones de inyección extemporánea a partir de comprimidos, gránulos y polvos estériles del tipo descrito anteriormente.

Las formulaciones inyectables son según una realización de la invención. Los requisitos para portadores farmacéuticos eficaces para composiciones inyectables los conocen bien los expertos habituales en la técnica (véanse, por ejemplo, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J.B. Lippincott Company, Filadelfia, PA, Banker y Chalmers, eds., páginas 238-250 (1982), y *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4ª ed., páginas 622-630 (1986)).

Los expertos en la técnica conocen bien formulaciones tópicas, incluyendo las que son útiles para la liberación transdérmica de fármacos, y son adecuadas en el contexto de realizaciones de la invención para su aplicación a la piel. El material de CAR de la invención, solo o en combinación con otros componentes adecuados, puede prepararse para dar formulaciones de aerosol que van a administrarse por medio de inhalación. Estas formulaciones de aerosol pueden colocarse en propelentes aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares. También pueden formularse como productos farmacéuticos para preparaciones no presurizadas, tal como en un nebulizador o un atomizador. Tales formulaciones de pulverización también pueden usarse para pulverizar la mucosa.

Una "cantidad eficaz" o "una cantidad eficaz para tratar" se refiere a una dosis que es adecuada para prevenir o tratar cáncer en un individuo. Las cantidades eficaces para un uso terapéutico o profiláctico dependerán, por ejemplo, del estadio y la gravedad de la enfermedad o trastorno que está tratándose, la edad, el peso y el estado general de salud del paciente, y el criterio del médico encargado. El tamaño de la dosis también estará determinado por el principio activo seleccionado, el método de administración, el momento y la frecuencia de administración, la existencia, naturaleza y magnitud de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar a la administración

de un principio activo particular, y el efecto fisiológico deseado. Un experto en la técnica apreciará que diversas enfermedades o trastornos requerirían tratamiento prolongado que implica múltiples administraciones, quizá usando los materiales de CAR de la invención en cada una o diversas rondas de administración. A modo de ejemplo y sin pretender limitar la invención, la dosis del material de CAR de la invención puede ser de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal del sujeto que está tratándose/día, desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal/día, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal/día. Cuando el material de CAR de la invención es una célula huésped, una dosis a modo de ejemplo de células huésped puede ser un mínimo de aproximadamente un millón de células (1 mg de células/dosis). Cuando el material de CAR de la invención es un ácido nucleico empaquetado en un virus, una dosis a modo de ejemplo de virus puede ser de aproximadamente 1 ng/dosis.

Para los fines de la invención, la cantidad o dosis del material de CAR de la invención administrada debe ser suficiente para efectuar una respuesta terapéutica o profiláctica en el sujeto o animal a lo largo de un lapso de tiempo razonable. Por ejemplo, la dosis del material de CAR de la invención debe ser suficiente para unirse a un antígeno, o detectar, tratar o prevenir una enfermedad en un periodo de desde aproximadamente 2 horas o más, por ejemplo, de aproximadamente 12 a aproximadamente 24 o más horas, desde el momento de la administración. En determinadas realizaciones, el periodo de tiempo podría ser incluso mayor. La dosis se determinará por la eficacia del material de CAR de la invención particular y el estado del animal (por ejemplo, ser humano), así como el peso corporal del animal (por ejemplo, ser humano) que va a tratarse.

Podría usarse un ensayo que comprende, por ejemplo, comparar el grado en el que se lisan células diana y/o se secreta IFN- γ por células T que expresan el CAR de la invención tras la administración de una dosis dada de tales células T a un mamífero, entre un conjunto de mamíferos a los que se les administra a cada uno una dosis diferente de las células T, para determinar una dosis de partida que va a administrarse a un mamífero. El grado en el que se lisan células diana y/o se secreta IFN- γ tras la administración de una determinada dosis puede someterse a ensayo mediante métodos conocidos en la técnica.

Además de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, los materiales de CAR de la invención pueden formularse como complejos de inclusión, tales como complejos de inclusión de ciclodextrina, o liposomas. Los liposomas pueden servir para dirigir los materiales de CAR de la invención a un tejido particular. Los liposomas también pueden usarse para aumentar la semivida de los materiales de CAR de la invención. Están disponibles muchos métodos para preparar liposomas, tal como se describe en, por ejemplo, Szoka *et al.*, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9, 467 (1980) y las patentes estadounidenses 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 y 5.019.369.

Los sistemas de administración útiles en el contexto de realizaciones de la invención pueden incluir sistemas de administración de liberación temporal, liberación retardada y liberación sostenida de manera que la administración de la composición de la invención se produce antes de, y con suficiente tiempo para provocar la sensibilización del sitio que va a tratarse. La composición de la invención puede usarse conjuntamente con otros agentes terapéuticos o terapias. Tales sistemas pueden evitar administraciones repetidas de la composición de la invención, aumentando de ese modo la comodidad del sujeto y el médico, y pueden ser particularmente adecuados para determinadas realizaciones de composición de la invención.

Muchos tipos de sistemas de administración de liberación están disponibles y los conocen los expertos habituales en la técnica. Incluyen sistemas de base de polímero tales como poli(lactida-glicolida), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, poli(ácido hidroxibutírico) y polianhídridos. Se describen microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos en, por ejemplo, la patente estadounidense 5.075.109. Los sistemas de administración también incluyen sistemas sin polímeros que son lípidos incluyendo esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono-di- y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; recubrimientos de cera; comprimidos sometidos a compresión usando aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fundidos; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a: (a) sistemas de erosión en los que la composición activa está contenida en una forma dentro de una matriz tal como los descritos en las patentes estadounidenses 4.452.775, 4.667.014, 4.748.034 y 5.239.660 y (b) sistemas de difusión en los que un componente activo permea a una velocidad controlada desde un polímero tal como se describe en las patentes estadounidenses 3.832.253 y 3.854.480. Además, pueden usarse sistemas de administración de equipo físico basado en bombas, algunos de los cuales están adaptados para implantación.

Un experto habitual en la técnica apreciará fácilmente que los materiales de CAR de la invención de la invención pueden modificarse dentro del significado de las reivindicaciones, de manera que la eficacia terapéutica o profiláctica de los materiales de CAR de la invención aumenta a través de la modificación. Por ejemplo, los materiales de CAR de la invención pueden conjugarse o bien directa o bien indirectamente a través de un ligador a un resto de direccionamiento. La práctica de conjugar compuestos, por ejemplo, materiales de CAR de la invención, con restos de direccionamiento se conoce en la técnica. Véanse, por ejemplo, Wadwa *et al.*, J. Drug Targeting 3: 111 (1995) y la patente estadounidense n.º 5.087.616.

Alternativamente, los materiales de CAR de la invención pueden modificarse para dar una forma de depósito, de modo que la manera en la que los materiales de CAR de la invención se liberan en el organismo al que se

administran se controla con respecto al tiempo y la ubicación dentro del organismo (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 4.450.150). Las formas de depósito de los materiales de CAR de la invención pueden ser, por ejemplo, una composición implantable que comprende los materiales de CAR de la invención y un material poroso o no poroso, tal como un polímero, en el que los materiales de CAR de la invención están encapsulados por o difundidos por todo el material y/o la degradación del material no poroso. El depósito se implanta entonces en la ubicación deseada dentro del organismo y los materiales de CAR de la invención se liberan del implante a una velocidad predeterminada.

Cuando los materiales de CAR de la invención se administran con uno o más agentes terapéuticos adicionales, pueden coadministrarse uno o más agentes terapéuticos adicionales al mamífero. Por "coadministración" quiere decirse administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales y los materiales de CAR de la invención suficientemente próximos en el tiempo de manera que los materiales de CAR de la invención pueden potenciar el efecto de uno o más agentes terapéuticos adicionales, o *viceversa*. En este sentido, los materiales de CAR de la invención pueden administrarse en primer lugar y el uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse en segundo lugar, o *viceversa*. Alternativamente, los materiales de CAR de la invención y el uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse simultáneamente. Un agente terapéutico a modo de ejemplo que puede coadministrarse con los materiales de CAR es IL-2. Se cree que la IL-2 potencia el efecto terapéutico de los materiales de CAR de la invención. Para los fines de los métodos de la invención, en el que se administran células huésped o poblaciones de células al huésped, las células pueden ser células que son alogénicas o autólogas para el huésped.

Se contempla que las composiciones farmacéuticas de la invención, CAR, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, células huésped o poblaciones de células puedan usarse en métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad en un huésped. Sin querer restringirse a ninguna teoría o mecanismo particular, los CAR de la invención tienen actividad biológica, por ejemplo, capacidad para reconocer un antígeno, por ejemplo, EGFRvIII, de manera que el CAR cuando lo expresa una célula puede mediar en una respuesta inmunitaria contra la célula que expresa el antígeno, por ejemplo, EGFRvIII, para el que el CAR es específico. En este sentido, una realización de la invención proporciona un uso para tratar o prevenir cáncer en un huésped, que comprende administrar al huésped los CAR, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinante, las células huésped, la población de células, y/o las composiciones farmacéuticas de la invención en una cantidad eficaz para tratar o prevenir cáncer en el huésped.

Una realización de la divulgación comprende además someter a linfodepleción al huésped antes de administrar los materiales de CAR de la invención. Los ejemplos de linfodepleción incluyen, pero no se limitan a, quimioterapia de linfodepleción no mieloablativa, quimioterapia de linfodepleción mieloablativa, irradiación corporal total, etc.

Para los fines de los usos médicos de la invención, en los que se administran células huésped o poblaciones de células, las células pueden ser células que son alogénicas o autólogas para el huésped. Preferiblemente, las células son autólogas para el huésped.

El huésped al que se hace referencia en el presente documento puede ser cualquier huésped. El huésped puede ser un mamífero. Tal como se usa en el presente documento, el término "mamífero" se refiere a cualquier mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, mamíferos del orden Rodentia, tales como ratones y hámsteres, y mamíferos del orden Lagomorpha, tales como conejos. Los mamíferos pueden ser del orden Carnivora, incluyendo felinos (gatos) y caninos (perros). Los mamíferos pueden ser del orden Artiodactyla, incluyendo bovinos (vacas) y porcinos (cerdos) o del orden Perssodactyla, incluyendo equinos (caballos). Los mamíferos pueden ser del orden Primates, cébidos o simios (monos) o del orden Anthropeidea (seres humanos y simios). Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

Con respecto a los usos médicos de la invención, el cáncer puede ser cualquier cáncer, incluyendo cualquiera de cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rabdiosarcoma alveolar, cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma de vejiga), cáncer de huesos, cáncer cerebral (por ejemplo, meduloblastoma), cáncer de mama, cáncer del ano, canal anal o anorrecto, cáncer del ojo, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de las articulaciones, cáncer del cuello, la vesícula biliar o la pleura, cáncer de la nariz, cavidad nasal u oído medio, cáncer de la cavidad oral, cáncer de la vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer esofágico, cáncer de cuello uterino, fibrosarcoma, tumor carcinoide gastrointestinal, cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia, tumores líquidos, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas), linfoma, mesotelioma maligno, mastocitoma, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, linfoma no Hodgkin, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de peritoneo, epiplón y mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, cáncer de tejidos blandos, tumores sólidos, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides y cáncer de uréter. Preferiblemente, el cáncer es glioma (por ejemplo, ependimoma, astrocitoma, oligodendroglioma y oligoastrocitoma), más preferiblemente, glioblastoma multiforme (GBM) (también conocido como glioblastoma, astrocitoma de grado IV, y astrocitoma de grado IV). Preferiblemente, el cáncer se caracteriza por la expresión de EGFRvIII.

Los términos “tratar” y “prevenir” así como palabras que provienen de las mismas, tal como se usan en el presente documento, no implican necesariamente tratamiento o prevención al 100% o completo. Más bien, hay grados variables de tratamiento o prevención de los cuales un experto habitual en la técnica reconoce que tienen un posible beneficio o efecto terapéutico. En este sentido, los usos médicos de la invención pueden proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de tratamiento o prevención de cáncer en un mamífero. Además, el tratamiento o la prevención proporcionado por el uso médico de la invención pueden incluir tratamiento o prevención de uno o más estados o síntomas de la enfermedad, por ejemplo, cáncer, que están tratándose o previniéndose. Además, para los fines en el presente documento, “prevención” puede abarcar retrasar el comienzo de la enfermedad, o un síntoma o estado de la misma.

Otra realización de la invención proporciona los CAR de la invención, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, células huésped, poblaciones de células o composiciones farmacéuticas, para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer en un huésped.

Otra realización de la invención proporciona un método de detección de la presencia de cáncer en un huésped, que comprende: (a) poner en contacto una muestra que comprende una o más células del huésped con los CAR, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinante, las células huésped, la población de células, los anticuerpos y/o las porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención, formando de ese modo un complejo, (b) y detectar el complejo, en el que la detección del complejo es indicativa de la presencia de cáncer en el huésped.

La muestra puede obtenerse mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, biopsia o necropsia. Una biopsia es la extirpación de tejido y/o células de un individuo. Tal extirpación puede ser para recoger tejido y/o células del individuo con el fin de realizar experimentación sobre el tejido y/o las células extirpados. Esta experimentación puede incluir experimentos para determinar si el individuo tiene y/o padece un determinado estado o estado patológico. El estado o enfermedad puede ser, por ejemplo, cáncer.

Con respecto a una realización del método de la invención de detección de la presencia de cáncer en un huésped, la muestra que comprende células del huésped puede ser una muestra que comprende células completas, lisados de de las mismas o una fracción de los lisados celulares completos, por ejemplo, una fracción nuclear o citoplasmática, una fracción proteica completa o una fracción de ácido nucleico. Si la muestra comprende células completas, las células pueden ser cualquier célula del huésped, por ejemplo, las células de cualquier órgano o tejido, incluyendo células sanguíneas o células endoteliales.

Para los fines del método de detección de la invención, la puesta en contacto puede tener lugar *in vitro*.

Además, la detección del complejo puede producirse a través de cualquiera de varios modos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los TCR, polipéptidos, proteínas o anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, y ácidos nucleicos de la invención, vectores de expresión recombinante, células huésped y población de células descritos en el presente documento, pueden estar marcados con un marcador detectable tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa del rábano) y partículas de elementos (por ejemplo, partículas de oro).

Se conocen en la técnica métodos para someter a prueba un CAR para determinar la capacidad para reconocer células diana y para determinar la especificidad de antígeno. Por ejemplo, Clay *et al.*, J. Immunol., 163: 507-513 (1999), enseñan métodos de medición de la liberación de citocinas (por ejemplo, interferón- γ , factor estimulante de las colonias de granulocitos/monocitos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o interleucina 2 (IL-2)). Además, la función de CAR puede evaluarse mediante la medición de la citotoxicidad celular, tal como se describe en Zhao *et al.*, J. Immunol., 174: 4415-4423 (2005).

Los siguientes ejemplos ilustran además la invención pero, por supuesto, no debe interpretarse que limitan de ningún modo su alcance.

45 EJEMPLO 1

Este ejemplo demuestra que un CAR que comprende SEQ ID NO: 10 (h139Ab-hCD828BBZ) o SEQ ID NO: 11 (h139Ab-hCD28Z) produce IFN-gamma tras el cocultivo con líneas celulares diana modificadas por ingeniería genética con EGFRvIII.

Se produjeron receptores de antígenos quiméricos que seleccionan como diana EGFRvIII combinando secuencias de anticuerpo de cadena sencilla a partir de 7 anticuerpos anti-EGFRvIII diferentes con los dominios de señalización de células T de CD28 y CD3zeta. Se ensamblaron un total de 9 constructos diferentes (en 2 constructos se cambió el orden del VL y VH) basándose en los anticuerpos murinos 3C10, MR-1, Y10, L8A4, y los anticuerpos humanos 131, 139 y 13.1.2, que se insertaron en el vector γ -retroviral MSGV1. La expresión de cada constructo se sometió a prueba mediante la transducción de linfocitos de sangre periférica (PBL) y análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) usando un reactivo específico anti-Fab (o proteína L en experimentos posteriores). Tres de los nueve vectores construidos demostraron de manera reproducible expresión de CAR en PBL transducidos, específicamente se mostró que los CAR basados en los anticuerpos 3C10, L8A4 y 139 (SEQ ID NO: 11) tienen

tinción de superficie celular en PBL transducidos.

Para someter a prueba la actividad biológica de estos 3 constructos de CAR anti-EGFRvIII, se produjo sobrenadante de vector γ -retroviral y se usó para transducir PBL, que se cocultivaron con líneas celulares diana que expresan EGFRvIII. Con el fin de desarrollar un sistema *in vitro* para evaluar posibles vectores de selección como diana de EGFRvIII, se estableció una línea celular diana apropiada porque ninguna línea celular de glioblastoma conocida expresa EGFRvIII. Se obtuvo el gen de EGFR silvestre de fuentes comerciales y se construyó la forma vIII mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se insertó en un vector retroviral, que coexpresaba un gen de NeoR. Se transdujeron y seleccionaron varias líneas celulares (NIH-3T3, BHK, HEK-293GP, U87 y U251) y se determinó la expresión de EGFRvIII mediante un anticuerpo específico frente a vIII.

Se demostró producción de IFN-gamma específica para los tres constructos mediante cocultivo con líneas celulares establecidas modificadas por ingeniería genética con EGFRvIII (figuras 3A, 3B y 3C, datos representativos para cocultivos con líneas derivadas de NIH-3T3, BHK y 293GP). Se cocultivaron células BHK (BHK), BHK transducidas con EGFR (BHK-EGFRwt), BHK transducidas con EGFRvIII (BHK-EGFR vIII), células 3T3 (3T3UT), 3T3 transducidas con EGFR (3T3-EGFRwt), 3T3 transducidas con EGFRvIII (3T3-EGFRvIII), células 293GP (293GPWT), o 293GP transducidas con EGFRvIII (293GP-EGFRvIII), con los CAR-PBL transducidos indicados (o PBL no transducidos (UT) como controles) y se determinaron los niveles de IFN-gamma (los valores son IFN-gamma en pg/ml tras cocultivo durante la noche). En estos ensayos de cocultivo, los tres CAR de 3C10, L8A4 y 139 produjeron una producción de IFN- γ específica cuando se expusieron a células diana que expresan EGFRvIII, pero no a células modificadas por ingeniería genética para sobreexpresar el gen de EGFR silvestre. Basándose en la observación de que el CAR de 139 era ligeramente más reactivo y es de origen humano, y por tanto es menos probable que sea inmunogénico en pacientes, todos los ensayos posteriores se realizaron con el constructo de CAR basado en scFv 139 (SEQ ID NO: 11). Se clasificaron células T de dos donantes que se transdujeron con el CAR de 139 en poblaciones de células T CD8 y CD4 y se sometieron a prueba independientemente para determinar la reactividad (figuras 4A (donante 2) y 4B (donante 3)). Tanto células T CD4 como CD8 produjeron específicamente IFN- γ en cocultivo con células diana de EGFRvIII.

La adición de elementos de señalización de células T a partir de la molécula coestimuladora 41BB puede potenciar la supervivencia de células T modificadas por ingeniería genética con CAR. Se ensambló un nuevo constructo usando dominios de señalización de CD28-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 13) y se compararon con el constructo de CD28-CD3zeta original (SEQ ID NO: 14). Aunque la detección de la construcción del vector de CAR de 28BBZ mediante FACS fue menor que el constructo 28Z, las células T transducidas eran igualmente reactivas contra dianas que expresaban EGFRvIII. Se transdujeron células T con estos vectores y vectores de control (GFP o el CAR de Her2/neu) y se cocultivaron con líneas celulares de glioblastoma modificadas por ingeniería genética y líneas de células madre de tumor multiforme de glioblastoma (GBM-TSC) (tablas 3A y 3B). Se modificaron por ingeniería genética las líneas de glioblastoma establecidas U87 y U251 para que expresaran un gen de GFP de control, el gen de EGFR silvestre (EGFRwt) o el gen de EGFRvIII (EGFRvIII). Se cocultivaron estas células diana o líneas de GBM-TSC 308, 822 y 1228 con células T transducidas con los vectores de EGFRvIII-CAR que contienen los dominios de señalización de CD28-CD3zeta (139-28Z) (SEQ ID NO: 14) o CD28-41BB-CD3zeta (139-BBZ; h139Ab-hCD828BBZ) (SEQ ID NO: 13). Se determinaron los niveles de IFN- γ (los valores son IFN- γ en pg/ml tras cocultivo durante la noche con líneas celulares de glioblastoma modificadas por ingeniería genética para expresar EGFRvIII). Los controles de células T adicionales incluyeron UT-PBL no transducidos, PBL transducidos con vector de GFP-GFP y un CAR específico de Her2/neu. La actividad biológica, tal como se determinó mediante la liberación de IFN- γ (tabla 3A y 3B), demostró que las dos células T transducidas con vector diferentes eran igualmente reactivas contra las líneas celulares de glioma que expresan EGFRvIII U87 y U251.

TABLA 3A

Célula T efectora	Células U87 (IFN- γ , pg/ml)			Células U251 (IFN- γ , pg/ml)		
	GFP	EGFR wt	EGFRvIII	UT	EGFR wt	EGFRvIII
GFP	389	236	339	0	0	0
139-28Z	451	561	1797	0	0	2743
139-28BBZ	460	499	2117	0	0	1820
ERBB2	1061	671	932	1195	2201	2692

TABLA 3B

	UT	GFP	139-28Z	139-BBZ	HER2/Neu
GBM-TSC 308	0	35	987	1123	578
GBM-TSC 822	0	95	1683	2267	372
GBM-TSC 1228	0	0	1387	1493	371

EJEMPLO 2

Este ejemplo demuestra que un CAR que comprende SEQ ID NO: 10 (h139Ab-hCD828BBZ) o SEQ ID NO: 11

(h139Ab-hCD28Z) lisa específicamente líneas celulares modificadas por ingeniería genética para expresar el EGFRvIII mutante.

Se determinó a continuación la capacidad de células T modificadas por ingeniería genética con CAR de EGFRvIII para lisar células diana en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr convencional (figuras 1A-D y 2A-D).

5 Se cocultivaron PBL no transducidos (UnTd) o PBL transducidos con vector de GFP de control (GFP), CAR de 139-28Z (vIII-28Z) (que codifica para SEQ ID NO: 11) o 139-28BBZ (vIII-BBZ) (que codifica para SEQ ID NO: 10) durante cuatro horas con líneas celulares tumorales diana marcadas con ⁵¹Cr (figuras 1A-1D: U87 original, modificadas por ingeniería genética con GFP, EGFR silvestre o EGFRvIII).

10 Se cocultivaron PBL no transducidos (UnTd) o PBL transducidos con vector de GFP de control (GFP), CAR anti-ERBB2 (ERBB2), CAR de 139-28Z (vIII-28Z) (que codifica para SEQ ID NO: 11) o 139-28BBZ (vIII-BBZ) (que codifica para SEQ ID NO: 10) durante cuatro horas con líneas celulares tumorales diana marcadas con ⁵¹Cr (figuras 2A-2D: U251 original, modificadas por ingeniería genética con GFP, EGFR silvestre o EGFRvIII).

15 En los experimentos de las figuras 1A-1D y 2A-2D, se midió la lisis específica de células tumorales a la razón E:T dada usando la fórmula: [(liberación específica-liberación espontánea)/liberación total-liberación espontánea]. Tal como se muestra en las figuras 1A-1D y 2A-D, ambos vectores lisaron específicamente sólo líneas celulares modificadas por ingeniería genética para expresar el EGFRvIII mutante y no líneas celulares modificadas por ingeniería genética con EGFR silvestre o de control.

EJEMPLO 3

20 Este ejemplo demuestra que un CAR anti-EGFRvIII (SEQ ID NO: 10 (h139Ab-hCD828BBZ)) produce IFN-gamma tras cocultivo con líneas de células madre tumorales (TSC).

25 Mediante un análisis molecular detallado de muchas clases diferentes de líneas de células cancerosas, se ha demostrado ahora que líneas de células cancerosas establecidas a menudo no reflejan las características moleculares de cánceres humanos primarios y este es el caso de las líneas de glioma. Una alternativa al uso de líneas celulares de glioma establecidas es el análisis de líneas de células madre tumorales (TSC). El paradigma de TSC propone que existe una subpoblación de células en cáncer que da lugar a todas las células en un tumor diferenciado. Se ha demostrado que células de glioma *in situ* comparten propiedades no encontradas en líneas celulares de glioma, y albergan características consecuentes con células madre tumorales. Se demostró además que existen diferencias fenotípicas y genotípicas marcadas entre TSC derivadas de tumor humano primario y sus líneas celulares de glioma coincidentes. Las TSC derivadas directamente de glioblastomas primarios albergan extensas similitudes con células madre neurales normales y recapitulan el genotipo, los patrones de expresión génica y la biología *in vivo* de glioblastomas humanos. Estos hallazgos sugieren que las TSC derivadas de glioma pueden ser un modelo más fiable que muchas líneas celulares de glioma comúnmente utilizadas para entender la biología de tumores humanos primarios.

35 Por tanto, se analizaron tres líneas de TSC para determinar la presencia de EGFRvIII y se demostró mediante RT-PCR que EGFRvIII se expresa en estas líneas. Entonces se modificaron por ingeniería genética PBL de dos donantes (efector I y efector II) con el vector de CAR anti-EGFRvIII (que expresa SEQ ID NO: 10 (h139Ab-hCD828BBZ)) y se cocultivaron con líneas de TSC de glioma y líneas celulares que expresan EGFRvIII de control. Se cocultivaron cinco PBL tras la transducción con líneas de TSC de glioma o la línea celular U251 que se había modificado por ingeniería genética para expresar EGFR silvestre, o EGFRvIII. Células no transducidas (UT) y células transducidas con GFP sirvieron como controles negativos y un CAR anti-ERBB2 sirvió como control positivo en todos los cocultivos. Tal como se muestra en las figuras 5A y 5B, células T modificadas por ingeniería genética con CAR de EGFRvIII demostraron reconocimiento específico del EGFRvIII de U251, cuando se compararon con las células modificadas por ingeniería genética con gen silvestre de EGFR de U251, y reconocieron las tres líneas de TSC de glioma sometidas a prueba (308, 822 y 1228). Estos resultados apoyan el uso de células T modificadas por ingeniería genética con CAR de EGFRvIII como posible inmunoterapia para pacientes con glioma.

EJEMPLO 4

Este ejemplo demuestra que células T modificadas por ingeniería genética con CAR conservan la reactividad tras la expansión del número de células T.

50 Se usó el vector de 139-28BBZ (h139Ab-hCD828BBZ) para transducir PBL a partir de dos pacientes con glioblastoma, así como un donante sano y se sometieron a prueba para determinar la expresión y reactividad. Se cocultivaron células transducidas con células U87 modificadas por ingeniería genética con EGFRvIII y entonces se sometieron a ensayo mediante tinción de citocina intracelular. Células T modificadas por ingeniería genética de los pacientes y el donante sano demostraron producción de IFN- γ específica en células T tanto CD8+ como CD8- (presumiblemente CD4+) CD3+ (el 7,8%-16,2% de IFN- γ +, frente a > 0,36% contra la línea U87 de control). La eficacia de transducción fue también similar entre las células del paciente con glioblastoma y el donante sano. Si se requieren grandes números de células T (>1 X 10⁹) para futuras aplicaciones clínicas, esta pueden obtenerse por medio de, por ejemplo, un protocolo de expansión rápida de 14 días (REP) (Riddell *et al.*, J. Immunol. Methods, 128:

189-201 (1990)). Para verificar que las células T transducidas con CAR de 139-28BBZ (h139Ab-hCD828BBZ) podrían expandirse hasta números suficientes para el tratamiento de pacientes, y todavía mantener la reactividad, se sometieron estas células T a REP y volvieron a someterse a prueba. Las células T transducidas con CAR de 139 conservaban su capacidad para producir específicamente IFN- γ tal como se muestra en la tabla 4.

5

TABLA 4

	Elispot de IFN- γ por 1×10^6 células					
	Donante 6		GBM-1		GBM-2	
	UT	CAR	UT	CAR	UT	CAR
U87	0	<500	0	0	0	<500
vIII	0	>5500	0	>5500	0	>5500
PHA	5000	3500	2800	1500	4500	5000

EJEMPLO 5

Este ejemplo demuestra la producción de un clon celular productor útil para producir sobrenadante de vectores virales para transducir células.

- 10 Usando el constructo de CAR de EGFRvIII de 139-28BBZ (h139Ab-hCD828BBZ), se produjo un clon celular productor de vector γ -retroviral PG13 en condiciones que cumplen las directrices de la Food and Drug Administration (FDA) de los EE.UU. para ensayos clínicos de terapia génica en seres humanos. Se usó un clon celular (clon F10) para producir 18 l de sobrenadante de vector viral en 6 cosechas recogidas a lo largo de 4 días. Cada cosecha se usó para transducir PBL de donantes y se determinaron la eficacia de transferencia génica y actividad biológica.
- 15 Todas las cosechas produjeron sobrenadante biológicamente activo basándose en la capacidad de las células T transducidas para expresar el CAR y para reconocer específicamente líneas celulares que expresan EGFRvIII. La cosecha 1 era ligeramente menos reactiva que las cosechas 2-6 en este ensayo. Para someter a prueba la posible toxicidad contra tejidos humanos normales, se usó un conjunto de las cosechas 3 y 4 para transducir un donante diferente y se cocultivaron estas células T transducidas con siete cultivos celulares neonatales y adultos humanos primarios diferentes de origen epitelial, endotelial y de fibroblastos. Tal como se determinó mediante la producción
- 20 de IFN- γ , no hubo reactividad de las células T transducidas con CAR de EGFRvIII con ningún cultivo celular humano primario sometido a prueba.

EJEMPLO 6

- 25 Este ejemplo demuestra un método de tratamiento o prevención de cáncer en un paciente humano que comprende administrar al paciente un CAR que comprende SEQ ID NO: 10 (h139Ab-hCD828BBZ).

Elegibilidad

- 30 Los pacientes elegibles tienen glioblastoma comprobado histológicamente que expresa EGFRvIII tal como se determina mediante inmunohistoquímica (IHC); tratamiento convencional previo fallido con radioterapia con o sin quimioterapia; una puntuación de Karnofsky mayor de o igual al 60%; parámetros cardíacos, pulmonares y de laboratorio dentro de límites aceptables.

Diseño del estudio:

- 35 El estudio se realiza usando un diseño de fase I/II. Los pacientes se reúnen en tanto la porción de fase I como de fase II del ensayo en dos grupos: 1) pacientes con glioma maligno recurrente que requiere el uso de esteroides al inicio del tratamiento o 2) pacientes con glioma maligno recurrente que no requiere el uso de esteroides al inicio del tratamiento. Una vez que se determina la dosis tolerada máxima para cada grupo individual en la porción de fase I del ensayo, el estudio avanza a la porción de fase II. Los pacientes se reúnen de nuevo en los mismos dos grupos. Para cada uno de los dos grupos evaluados, el estudio se realiza usando un diseño de fase II de una única etapa.

- 40 Los pacientes reciben un régimen preparativo no mieloablativo pero que produce linfodepleción que incluye ciclofosfamida y fludarabina seguido por infusión intravenosa de PBMC transducidas con gen de CAR de EGFRvIII reactivas con tumor *ex vivo*, más aldesleucina intravenosa (i.v.) (720.000 UI/kg cada 8 h durante un máximo de 15 dosis). Los pacientes se someten a evaluación completa del tumor con examen físico y neurológico, IRM del cerebro con y sin gadolinio, y evaluación de laboratorio clínico cuatro semanas (+/- 7 días) tras la finalización del tratamiento. Si el paciente tiene enfermedad estable o contracción tumoral, se realizan evaluaciones completas repetidas cada mes (+/- 7 días). Tras el primer año, se continúa el seguimiento de los pacientes que siguen respondiendo con esta
- 45 evaluación cada 2 meses (+/- 7 días) según sea apropiado.

Preparación de células:

Se obtienen PBMC mediante leucoféresis (aproximadamente 1×10^{10} células). Se cultivan PBMC completas en presencia de anticuerpo anti-CD3 (OKT3) y aldesleucina con el fin de estimular el crecimiento de células T. La transducción se inicia mediante la exposición de aproximadamente 1×10^7 a 5×10^8 células a sobrenadante que

contiene el vector retroviral de CAR anti-EGFRvIII. Estas células transducidas se expanden y se someten a prueba para determinar su actividad antitumoral. Se determina la transferencia génica de CAR satisfactoria mediante análisis de FACS para la proteína CAR y se somete a prueba la reactividad antitumoral mediante la liberación de citocina tal como se mide en células que expresan EGFRvIII. La transferencia génica de CAR satisfactoria para cada población de PBL transducidos se define como >10% de células positivas para CAR y, para la actividad biológica, la secreción de interferón gamma debe ser de al menos 200 pg/ml y dos veces el nivel del fondo.

PBL transducidos con CAR anti-EGFRvIII:

Los PBL se transducen con sobrenadante retroviral que contiene el CAR anti-EGFRvIII quimérico. El sobrenadante de vector retroviral (PG13-139-F10) que codifica para un receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido contra el antígeno, EGFRvIII, se prepara y se conserva siguiendo condiciones de buenas prácticas de fabricación actuales (cGMP). El vector retroviral utiliza la estructura principal del vector retroviral MSGV1 e incluye 4.032 pb que incluyen la LTR en 5' del virus de células madre murinas (promotor), una señal de empaquetamiento que incluye sitios donadores de corte y empalme (SD) y aceptores de corte y empalme, proteína CAR basada en scFv anti-EGFRvIII humano (AcM 139) que contiene una señal de péptido señal (GM-CSFR humano), la región variable de cadena ligera de 139, un péptido ligador, la región variable de cadena pesada de 139, CD8 (bisagra, transmembrana), CD28 (región citoplasmática), 4-1BB (región citoplasmática) y TCR zeta (región citoplasmática), seguido por la LTR en 3' del virus de células madre murinas. El vector comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 13, que codifica para la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10. El título físico se determina mediante transferencia puntual de ARN según el certificado del promotor. El sobrenadante se almacena en SBVPF tras la finalización de la producción a -80°C con monitorización de la temperatura en todo momento. A petición, el sobrenadante se suministra sobre hielo seco para usarse en transducción *in vitro*. No se reutiliza la misma unidad de sobrenadante para diferentes pacientes. Se ha mostrado que el título retroviral es estable tras la descongelación inmediata y administración inmediata (recubrimiento de los pocillos de cultivo tisular previamente recubiertos con retronectina). La manipulación del vector sigue las directrices del bioseguridad de nivel 2 (BSL-2).

Fase I - Aumento de la dosis:

El protocolo comienza con un diseño de aumento de la dosis de fase 1, con ocho cohortes y con dos grupos diferentes (uno para pacientes que reciben esteroides en el momento del tratamiento y uno para pacientes que no reciben esteroides). Cada grupo se trata como un ensayo de aumento de la dosis totalmente independiente.

Inicialmente, el protocolo incluye 1 paciente en cada una de las primeras 3 cohortes de dosis a menos que el paciente experimente una toxicidad limitante de la dosis (DLT). Tras la cohorte 3, todas las cohortes posteriores avanzaron a un diseño de aumento de la dosis de fase 1, con 5 cohortes de n=3.

El número total de células modificadas por ingeniería genética con EGFRvIII transferidas para cada cohorte es según la tabla 5:

TABLA 5

Programa de aumento de la dosis	
Nivel de dosis	Dosis de células T con CAR anti-EGFRvIII
Cohorte 1 (grupo a y b)	10 ⁷
Cohorte 2 (grupo a y b)	3x10 ⁷
Cohorte 3 (grupo a y b)	10 ⁸
Cohorte 4 (grupo a y b)	3x10 ⁸
Cohorte 5 (grupo a y b)	10 ⁹
Cohorte 6 (grupo a y b)	3x10 ⁹
Cohorte 7 (grupo a y b)	10 ¹⁰
Cohorte 8 (grupo a y b)	3 - 6 x 10 ¹⁰

Los pacientes se incluyen secuencialmente, por tanto la inclusión no avanza hasta un nivel de dosis superior hasta que los pacientes se han tratado en la cohorte anterior. Sin embargo, se aumenta la dosis de los pacientes a la siguiente cohorte dentro de un grupo dado independientemente de lo que está ocurriendo en los otros estratos. Si no pueden hacerse crecer suficientes células para cumplir los criterios para la cohorte asignada, el paciente se incluye en la cohorte apropiada para el número de células infundidas.

En las cohortes 1 a 3, si el paciente experimenta un DLT, cinco pacientes más se tratarían a esa dosis para confirmar que no más de 1/6 pacientes tienen un DLT antes de avanzar al siguiente nivel superior. Si se ha identificado un nivel con 2 o más DLT en 3-6 pacientes, se reúnen cinco pacientes adicionales en la siguiente dosis más baja, para un total de 6, con el fin de caracterizar adicionalmente la seguridad de la dosis tolerada máxima antes de iniciar la porción de fase II. Si hay 1 o menos DLT en la primera cohorte, el estudio avanza a la segunda cohorte. Si se produce una toxicidad limitante de la dosis en la primera cohorte, esa cohorte se expande hasta n=6 pacientes. Si se producen dos DLT en la primera cohorte, se termina el estudio.

5 En las cohortes 4-8, si un único paciente experimenta una toxicidad limitante de la dosis debido a la infusión de células a un nivel de dosis particular, se tratarían tres pacientes más a esa dosis para confirmar que no más de 1/6 pacientes tienen una DLT antes de avanzar al siguiente nivel superior. Si se ha identificado un nivel con 2 o más DLT en 3-6 pacientes, se reúnen tres pacientes adicionales en la siguiente dosis más baja, para un total de 6, con el fin de caracterizar adicionalmente la seguridad de la dosis tolerada máxima antes de iniciar la porción de fase II.

La dosis celular tolerada máxima es la dosis más alta a la que ≤ 1 de 6 pacientes experimenta un DLT o el nivel de dosis más alto estudiado si no se observan DLT a ninguno de los tres niveles de dosis.

10 Antes de recibir las células PBL modificadas por ingeniería genética, todos los pacientes reciben un régimen preparativo no mieloablativo, pero que produce linfodepleción, que incluye ciclofosfamida y fludarabina seguido de uno a cuatro días por infusión intravenosa de PBL transducidos con gen de CAR de EGFRvIII reactivos con tumor *in vitro* más aldesleucina i.v. (720.000 UI/kg cada 8 h durante un máximo de 15 dosis).

La dosis celular tolerada máxima es la dosis más alta a la que < 1 de 6 pacientes experimenta una DLT o al nivel de dosis más alto estudiado si no se observan DLT a ninguno de los tres niveles de dosis.

15 La toxicidad limitante de la dosis se define tal como sigue: reacción alérgica de grado 2 o mayor o reacción que implica broncoespasmo o urticaria generalizada; todas las toxicidades de grado 3 y 4 con la excepción de: mielosupresión, definida como linfopenia, neutropenia y trombocitopenia; toxicidades esperadas de IL-2; toxicidades que se producen en el plazo de 24 horas tras la infusión de células (relacionadas con la infusión de células) que son reversibles hasta un grado 2 o menos en el plazo de 8 horas con dos dosis de paracetamol (650 mg) o dos dosis de difenhidramina (25 mg).

20 *Programa de tratamiento*

El programa de tratamiento se expone en la tabla 6:

TABLA 6

Terapia	Día	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	01	1	2	3	4
Ciclofosfamida (60 mg/kg)	X												
Fludarabina (25 mg/m ²)		X											
PBL con CAR anti-EGFRvIII													
Aldeleucina									X ¹				
Filgrastim ³ (5 mcg/kg/día)									X ²		X	X	X
Trimetoprim y sulfametoxazol (TMP/SMX) ⁴ 160 mg/800 mg	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fluconazol ⁵ (400 mg por v.o.)									X	X	X	X	X
Valaciclovir por v.o. o Aciclovir i.v. ⁶									X	X	X	X	X

¹De uno a cuatro días tras la última dosis de fludarabina

²Iniciar en el plazo de 24 horas tras la infusión celular

³Continuar hasta un recuento de neutrófilos > 1X10⁹/l durante 3 días consecutivos o > 5x10⁸/l.

⁴El programa de TMP/SMX debe ajustarse a cada día tres veces a la semana (lunes, miércoles, viernes) y continuar durante al menos seis meses y hasta CD4 > 200 X 2

⁵Continuar hasta ANC > 1000/mm³

⁶En pacientes positivos para VHS continuar hasta que ANC sea mayor de 1000/mm³

Pruebas inmunológicas:

La aféresis se realiza antes, y 4-6 semanas después, del tratamiento. A otros puntos de tiempo, se obtienen linfocitos de sangre periférica (PBL) del paciente a partir de sangre completa mediante purificación usando centrifugación sobre un cojín de Ficoll. Las alícuotas de estas PBMC 1) se crioconservan para la monitorización inmunológica de la función celular, 2) se someten a extracción de ADN y ARN para análisis de PCR de CAR y la estimación del número de copias del vector y 3) se someten a prueba los linfocitos directamente y tras el cultivo *in vitro*. La monitorización inmunológica directa incluye cuantificar células T reactivas con EGFRvIII mediante análisis de FACS usando tinción específica de CAR. Los ensayos inmunológicos *ex vivo* incluyen liberación de citocinas por PBL a granel (+/- estimulación con antígeno) y mediante otros estudios experimentales tales como citólisis si están disponibles suficientes células. Si los números de células son limitantes, se da preferencia al análisis directo de la actividad inmunológica. Los ensayos inmunológicos se normalizan mediante la inclusión de 1) PBMC antes de la infusión y 2) una alícuota de los PBL modificados por ingeniería genética crioconservados en el momento de la infusión. En general, diferencias de 2 a 3 veces en estos ensayos son indicativas de diferencias biológicas verdaderas.

Monitorización de ensayos de terapia génica: Persistencia y retrovirus de replicación competente (RCR):

Supervivencia de células modificadas por ingeniería genética: Se cuantifica la presencia de CAR y vector en muestras de PBMC usando técnicas de PCR establecidas. Se usa monitorización inmunológica usando tinción específica de CAR para aumentar el análisis basado en PCR. Esto proporciona datos para estimar la supervivencia *in vivo* de linfocitos derivados de las células infundidas. Además, se realiza la medición de células T CD4 y CD8 y se determinan estudios de estos subconjuntos de células T en la circulación usando ensayos de PCR específicos que pueden detectar la secuencia de ADN única para cada célula T modificada por ingeniería genética con vector retroviral.

Se obtienen muestras de sangre de los pacientes y se someten a análisis para la detección de RCR mediante PCR antes de la infusión de células y se realiza PCR de RCR a los 3 y 6 meses, y un año tras la administración de células. Las muestras de sangre se archivan anualmente después de eso si todas las pruebas previas han sido negativas con unos antecedentes clínicos breves. Si un paciente muere o desarrolla neoplasias durante este ensayo, se hacen esfuerzos para someter a ensayo una muestra de biopsia para detectar RCR. Si cualquier muestra tras el tratamiento es positiva, se emprenden análisis adicionales del RCR y un seguimiento del paciente más extenso, en consulta con la FDA. Los ensayos de PCR de RCR detectan el gen de la envuelta GaLV y los realiza bajo contrato el National Gene Vector Laboratory en la Universidad de Indiana. Los resultados de estas pruebas los mantiene el contratista que realiza las pruebas de RCR y el equipo de investigación del National Cancer Institute (NCI) Surgery Branch.

Debido a la naturaleza de estos estudios, es posible que se observe la expansión de clones de células T específicos como proliferación de células T reactivas con tumor en respuesta a antígenos tumorales. Por tanto, se tiene cuidado para rastrear la persistencia de células T tanto inmunológica como molecularmente. Se obtienen muestras de sangre (5-10 ml) para determinar la persistencia de células transducidas con CAR 1 mes tras la infusión de células, luego a los 3, 6, 12 meses, y luego anualmente después de eso. Si cualquier paciente muestra un alto nivel de persistencia de células transducidas con gen de CAR en el mes 6 (mediante PCR de ADN semicuantitativa usando cebadores específicos para secuencias de vector) las muestras previamente archivadas se someten a técnicas que permitirían la identificación de la clonalidad de las células transducidas con gen de CAR persistentes. Tales técnicas pueden incluir la clonación de células T o LAM-PCR 30. Si se identifica un clon de células T monoclonal o predominante derivado de células transducidas con gen de CAR durante el seguimiento, se identifican el sitio de integración y la secuencia, y posteriormente se analizan frente a la base de datos del genoma humano para determinar si las secuencias están asociadas con cualquier cáncer humano conocido. Si se observa un sitio de integración predominante, se usa la prueba de LAM-PCR o clonación de células T en un intervalo de no más de tres meses tras la primera observación para ver si el clon persiste o es transitorio. En todos los casos en los que la monoclonalidad es persistente y particularmente en casos en los que hay expansión del clon, independientemente de si se sabe o no que la secuencia está asociada con un cáncer humano conocido, el sujeto debe monitorizarse estrechamente para detectar signos de tumores malignos, de modo que el tratamiento, si está disponible, pueda iniciarse de manera temprana.

Evaluación tras el tratamiento (seguimiento)

Seguimiento de rutina: Los pacientes se evalúan 4 semanas (+/- 7 días) tras el régimen de tratamiento inicial (definido como el final de la última dosis de aldesleucina). Si el paciente tiene SD o contracción tumoral, se realizan evaluaciones completas repetidas mensualmente (+/- 7 días) durante 12 meses, y luego cada 1-2 meses (+/- 7 días) según sea apropiado.

Se realizan las siguientes evaluaciones en cada evaluación: I) examen físico, incluyendo examen neurológico y puntuación de Karnofsky; II) Chem 20: (sodio (Na), potasio (K), cloruro (Cl), CO₂ total (bicarbonato), creatinina, glucosa, nitrógeno de urea (BUN), albúmina, calcio total, magnesio total (Mg), fósforo inorgánico, fosfatasa alcalina, ALT/GPT, AST/GOT, bilirrubina total, bilirrubina directa, LD, proteína total, CK total, ácido úrico), hemograma

completo y panel de tiroides; III) CBC; IV) evaluación de la toxicidad; V) IRM del cerebro con y sin gadolinio; y VI) detección de RCR y persistencia de células transducidas con gen de CAR: (tal como se describió anteriormente).

5 Se realiza una aféresis de 5 litros en la primera visita de seguimiento sólo. Posteriormente, se obtienen 60 ml de sangre en las visitas de seguimiento (aproximadamente cada mes) durante al menos 3 meses. Las células mononucleares de sangre periférica se crioconservan de modo que puedan realizarse pruebas inmunológicas.

Seguimiento a largo plazo de pacientes que reciben transferencia génica:

10 Se realizan exámenes físicos y se documentan anualmente durante 5 años tras la infusión de células para evaluar la seguridad a largo plazo. Tras 5 años, se obtienen datos del estado de salud de los pacientes supervivientes por medio de contacto telefónico o cuestionarios enviados por correo. El periodo de seguimiento a largo plazo para vectores retrovirales es de 15 años.

Criterios de respuesta:

Como parte de este ensayo, así como para ayudar en la determinación de la progresión tumoral, se hacen todos los esfuerzos para observar cambios radiográficos en los tumores del paciente a lo largo del tiempo.

15 Enfermedad medible: Lesiones que potencian el contraste bidimensionalmente con márgenes claramente definidos mediante exploración por IRM, con dos diámetros perpendiculares de al menos 10 mm, visible en dos o más cortes axiales. La medición del tumor alrededor de un quiste o cavidad quirúrgica representa un desafío particularmente difícil. En general, tales lesiones deben considerarse no medibles a menos que haya un componente nodular que mida ≥ 10 mm de diámetro. La cavidad quirúrgica o quística no debe medirse en la determinación de la respuesta.

20 Enfermedad no medible pero evaluable: Lesiones medibles unidimensionalmente, masas con márgenes no claramente definidos, o lesiones con un componente quístico múltiple.

Enfermedad no evaluable: Tumor no definido, medible ni evaluable.

Lesiones medibles:

25 Respuesta completa (CR): La respuesta completa requiere todo lo siguiente: desaparición completa de toda la enfermedad medible y no medible en aumento sostenida durante al menos 4 semanas; sin nuevas lesiones; lesiones sin aumento estables o mejoradas (T2/FLAIR); y el paciente no debe tomar corticosteroides o sólo dosis de sustitución fisiológica, y estar estable o clínicamente mejorado. En ausencia de una exploración de confirmación 4 semanas después, esta respuesta se considera sólo enfermedad estable.

30 Respuesta parcial (PR): La respuesta parcial requiere todo lo siguiente: $\geq 50\%$ de disminución, en comparación con el nivel inicial, en la suma de productos de diámetros perpendiculares de todas las lesiones en aumento medibles sostenida durante al menos 4 semanas; sin progresión de la enfermedad no medible; sin nuevas lesiones; lesiones sin aumento estables o mejoradas (T2/FLAIR) con la misma dosis de corticosteroides o inferior en comparación con la exploración de nivel inicial; y el paciente debe tomar una dosis de corticosteroides no mayor que la dosis en el momento de la exploración de nivel inicial y está estable o mejorado clínicamente. En ausencia de una exploración de confirmación 4 semanas después, esta respuesta se considera sólo enfermedad estable.

35 Estable: Se produce enfermedad estable si el paciente no se califica para respuesta completa, respuesta parcial o progresión y requiere lo siguiente: lesiones sin aumento estables (T2/FLAIR) con la misma dosis o inferior de corticosteroides en comparación con la exploración de nivel inicial y estado clínicamente estable. En el caso de que la dosis de corticosteroides se aumentara para nuevos síntomas y signos sin confirmación de progresión de la enfermedad en la obtención de imágenes neurológicas, y la obtención de imágenes de seguimiento posterior muestra que se requería este aumento de corticosteroides debido a la progresión de la enfermedad, la última exploración que se considera que muestra enfermedad estable es la exploración obtenida cuando la dosis de corticosteroides era equivalente a la dosis de nivel inicial.

45 Progresión: La progresión se define mediante cualquiera de lo siguiente: $\geq 25\%$ de aumento en la suma de productos de diámetros perpendiculares de lesiones en aumento (en comparación con la mejor respuesta o con el nivel inicial sino hay disminución) con dosis estables o crecientes de corticosteroides; un aumento significativo en lesiones sin aumento T2/FLAIR con dosis estables o crecientes de corticosteroides en comparación con la exploración de nivel inicial o la mejor respuesta tras el inicio de la terapia, no debidas a acontecimientos comórbidos; la aparición de nuevas lesiones; progresión clara de lesiones no medibles; o deterioro clínico definido no atribuible a otras causas aparte del tumor, o a una disminución en la dosis de corticosteroides. No poder regresar a la evaluación como resultado de muerte o deterioro del estado debe considerarse también como progresión. Los pacientes con enfermedad en aumento no medible cuyas lesiones han aumentado significativamente de tamaño y se vuelven medibles (diámetro bidireccional mínimo de ≥ 10 mm y visibles en al menos dos cortes axiales) se considera también que han experimentado progresión. La transición desde una lesión no medible hasta una lesión medible que da como resultado progresión puede producirse teóricamente con aumentos relativamente pequeños del tamaño tumoral (por ejemplo, una lesión de 9 x 9 mm [no medible] que aumenta hasta una lesión de 10 x 11 mm [medible]).

Idealmente, el cambio debe ser significativo (> 5 mm de aumento del diámetro máximo o $\geq 25\%$ de aumento en la suma de los productos de diámetros perpendiculares de lesiones en aumento). En general, si hay dudas de si la lesión ha progresado, el tratamiento continuado y la evaluación de seguimiento estrecha ayudan a clarificar si hay progresión verdadera.

5 *Lesiones evaluables:*

Se registran las lesiones evaluables en cada evaluación. También deben evaluarse imágenes compensadas de FLAIR o T2 como enfermedad evaluable si es apropiado.

Se usa la siguiente escala para designar cambios relativos en las exploraciones de IRM:

+3 = desaparición del tumor (CR)

10 +2 = definitivamente mejor (PR)

+1 = posiblemente mejor

0 = sin cambios

-1 = posiblemente peor

-2 = definitivamente peor (PD)

15 -3 = desarrollo de una nueva lesión (PD).

Definición de respuesta para lesiones evaluables

Respuesta completa (CR): se define como la circunstancia cuando la exploración de IRM se clasifica como +3 y el tumor ya no se observa mediante obtención de imágenes neurológicas, y el paciente ya no requiere esteroides para el control del edema cerebral inducido por el tumor.

20 Respuesta parcial (PR): se define como una exploración de IRM clasificada como +2 siempre que el paciente no haya aumentado su dosis de esteroides desde el último periodo de evaluación.

Progresión (P): se define como la circunstancia cuando la exploración de IRM se clasifica como -2 ó -3, o la presencia de una nueva lesión.

25 Enfermedad estable (SD): se define como la circunstancia cuando la exploración de IRM no muestra cambios o posibles cambios (-1 o +1). Los pacientes deben estar recibiendo dosis estables o decrecientes de esteroides.

El uso de los términos “un” y “una” y “el/la” y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) ha de interpretarse que cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique otra cosa en el presente documento o los contradiga claramente el contexto. Los términos “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” y “que contiene” han de interpretarse como términos de extremos abiertos (es decir, que significan “que incluye, pero sin limitarse a”) a menos que se indique otra cosa. La mención de intervalos de valores en el presente documento pretende meramente servir como método de abreviatura de la referencia individual a cada valor independiente que se encuentra dentro del intervalo, a menos que se indique otra cosa en el presente documento, y cada valor independiente se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique otra cosa en el presente documento o lo contradiga claramente por lo demás el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o expresiones a modo de ejemplo (por ejemplo, “tal como”) proporcionados en el presente documento, pretende meramente clarificar mejor la invención y no supone una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique otra cosa. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debe interpretarse que indica que cualquier elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la invención.

Se describen realizaciones preferidas de esta invención en el presente documento, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Pueden resultarles evidentes variaciones de las realizaciones preferidas a los expertos habituales en la técnica tras la lectura de la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos en la técnica empleen tales variaciones según sea apropiado.

45 **Lista de secuencias**

<110> ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA, REPRESENTADOS POR EL SECRETARIO DEL DEPARTAMENTO DE SALUD Y SERVICIOS HUMANOS

50 <120> RECEPTORES DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS ANTI-VARIANTE III DE RECEPTOR DE FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO Y USO DE LOS MISMOS PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER

<130> 709980

<150> Documento US 61/473.409

5 <151> 08-04-2011

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 1

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ile Val Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His His Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 2

<211> 116

20 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Glu Val Gln Val Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

ES 2 696 000 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Gly Ser Ser Gly Trp Ser Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3
 <211> 17
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

10 <400> 3
 Arg Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly
 1 5 10 15

Ser

15 <210> 4
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 4
 Met Val Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro
 20

25 <210> 5
 <211> 262
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>

ES 2 696 000 T3

<223> Sintética

<400> 5

Met Val Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Gly Ile Arg Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ile
85 90 95

Val Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln
100 105 110

His His Ser Tyr Pro Leu Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu
130 135 140

Gly Ser Glu Val Gln Val Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
145 150 155 160

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
165 170 175

Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
180 185 190

Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp
195 200 205

ES 2 696 000 T3

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 210 215 220

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 225 230 235 240

Tyr Cys Ala Gly Ser Ser Gly Trp Ser Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 245 250 255

Leu Val Thr Val Ser Ser
 260

<210> 6

<211> 83

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro
 1 5 10 15

Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
 20 25 30

Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
 35 40 45

Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
 50 55 60

Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn
 65 70 75 80

His Arg Asn

10

<210> 7

<211> 200

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<400> 7

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Phe Ser Val Val Lys Arg

ES 2 696 000 T3

50

55

60

Trp Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met
65 70 75 80

Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala
85 90 95

Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
100 105

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 9

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

10

<210> 10

<211> 548

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Sintética

<400> 10

Met Val Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
20 1 5 10 15

20

ES 2 696 000 T3

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Gly Ile Arg Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ile
 85 90 95

Val Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln
 100 105 110

His His Ser Tyr Pro Leu Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu
 130 135 140

Gly Ser Glu Val Gln Val Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 145 150 155 160

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 165 170 175

Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 180 185 190

Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp
 195 200 205

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 210 215 220

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 225 230 235 240

Tyr Cys Ala Gly Ser Ser Gly Trp Ser Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 245 250 255

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Phe Val Pro Val Phe Leu Pro
 260 265 270

ES 2 696 000 T3

Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro
 275 280 285

Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro
 290 295 300

Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
 305 310 315 320

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 325 330 335

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Ser Lys Arg
 340 345 350

Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
 355 360 365

Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
 370 375 380

Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys
 385 390 395 400

Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr
 405 410 415

Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly
 420 425 430

Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
 435 440 445

Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
 450 455 460

Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
 465 470 475 480

Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
 485 490 495

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
 500 505 510

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly

ES 2 696 000 T3

	515		520		525														
	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala			
	530						535					540							
	Leu	Pro	Pro	Arg															
	545																		
	<210>	11																	
	<211>	484																	
5	<212>	PRT																	
	<213>	Secuencia artificial																	
	<220>																		
	<223>	Sintética																	
10	<400>	11																	
	Met	Val	Leu	Leu	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Cys	Glu	Leu	Pro	His	Pro			
	1				5					10					15				
	Ala	Phe	Leu	Leu	Ile	Pro	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser			
			20						25					30					
	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser			
			35					40					45						
	Gln	Gly	Ile	Arg	Asn	Asn	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys			
	50						55					60							
	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	Gln	Ser	Gly	Val			
	65					70					75					80			
	Pro	Ser	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Ile			
				85						90					95				
	Val	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln			
				100					105					110					
	His	His	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile			
			115					120					125						
	Lys	Arg	Thr	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly	Glu			
	130						135					140							
	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Val	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro			
	145					150					155					160			
	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser			
					165					170					175				

ES 2 696 000 T3

Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
180 185 190

Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp
195 200 205

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
210 215 220

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
225 230 235 240

Tyr Cys Ala Gly Ser Ser Gly Trp Ser Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
245 250 255

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro
260 265 270

Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys
275 280 285

Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro
290 295 300

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
305 310 315 320

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
325 330 335

Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
340 345 350

Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
355 360 365

Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
370 375 380

Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
385 390 395 400

Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
405 410 415

Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn

ES 2 696 000 T3

420

425

430

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
435 440 445

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
450 455 460

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
465 470 475 480

Leu Pro Pro Arg

<210> 12
<211> 786
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Sintética

<400> 12
atgggttctg tggtcaccag cctgctgctg tgcgaactgc cccaccccgc ctttctgctg 60
atccccgaca tccagatgac ccagagccct agcagcctga gcgccagcgt gggcgacaga 120
gtgaccatca cctgtcgggc cagccagggc atcagaaaca acctggcctg gtatcagcag 180
aagcccggca aggcccccaa gagactgatc tacgctgcca gcaatctgca gagcggcgtg 240
cccagcagat tcaccggaag cggctccggc accgagttca ccctgatcgt gtccagcctg 300
cagcccgagg acttcgccac ctactactgc ctgcagcacc acagctaccc tctgaccagc 360
ggcggaggca ccaaggtgga gatcaagcgg accggcagca ccagcggcag cggcaagcct 420
ggcagcggcg agggaagcga ggtccagggt ctggaatctg gcggcggact ggtgcagcct 480
ggcggcagcc tgagactgag ctgtgccgcc agcggcttca cttcagcag ctacgccatg 540
tcttgggtcc ggcaggctcc tggaaagggc ctggaatggg tgtccgccat cagcggctct 600
ggcggctcca ccaactacgc cgacagcgtg aagggccggt tcaccatcag cggggacaac 660
agcaagaaca ccctgtatct gcagatgaac agcctgagag ccgaggacac cgccgtgtac 720
tactgtgccg gcagcagcgg gtggagcag tactggggcc agggcacact ggtcacagtg 780
tctagc 786

<210> 13
15 <211> 1647
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Sintética

<400> 13

ES 2 696 000 T3

atggttctgc tggtcaccag cctgctgctg tgcgaactgc cccaccccgc ctttctgctg 60
 atccccgaca tccagatgac ccagagccct agcagcctga gcgccagcgt gggcgacaga 120
 gtgaccatca cctgtcgggc cagccagggc atcagaaaca acctggcctg gtatcagcag 180
 aagccccggca aggcccccaa gagactgatc tacgctgcca gcaatctgca gagcggcgtg 240
 cccagcagat tcaccggaag cggctccggc accgagttca ccctgatcgt gtccagcctg 300
 cagccccgagg acttcgccac ctactactgc ctgcagcacc acagctaccc tctgaccagc 360
 ggcggaggca ccaaggtgga gatcaagcgg accggcagca ccagcggcag cggcaagcct 420
 ggcagcggcg agggaagcga ggtccaggtg ctggaatctg gcggcggact ggtgcagcct 480
 ggcggcagcc tgagactgag ctgtgccgcc agcggcttca ccttcagcag ctacgccatg 540
 tcttgggtcc ggcaggctcc tggaaagggc ctggaatggg tgtccgccat cagcggctct 600
 ggcggctcca ccaactacgc cgacagcgtg aagggccggg tcaccatcag ccgggacaac 660
 agcaagaaca ccctgtatct gcagatgaac agcctgagag ccgaggacac cgccgtgtac 720
 tactgtgccg gcagcagcgg gtggagcgg tactggggcc agggcacact ggtcacagtg 780
 tctagcggg ccgcattcgt gccggtcttc ctgccagcga agcccaccac gacgccagcg 840
 ccgcgaccac caacaccggc gccaccatc gcgtcgcagc ccctgtccct gcgccagag 900
 gcgtgccggc cagcggcggg ggcgcagtg cacacgaggg ggctggactt cgcctgtgat 960
 atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtggggctc ttctcctgtc actggttatc 1020
 accctttact gcaaccacag gaacaggagt aagaggagca ggctcctgca cagtgactac 1080
 atgaacatga ctccccgccg ccccgggccc acccgcaagc attaccagcc ctatgccccca 1140
 ccacgcgact tcgcagccta tcgctcccgt ttctctggtg ttaaaccgggg cagaaagaag 1200
 ctctgtata tattcaaca accatttatg agaccagtac aaactactca agaggaagat 1260
 ggctgtagct gccgatttcc agaagaagaa gaaggaggat gtgaactgag agtgaagtcc 1320
 agcaggagcg cagacgcccc cgcgtaccag cagggccaga accagctcta taacgagctc 1380
 aatctaggac gaagagagga gtacgatgtt ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag 1440
 atggggggaa agccgagaag gaagaaccct caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa 1500
 gataagatgg cggaggccta cagtgagatt gggatgaaag gcgagcggcg gaggggcaag 1560
 gggcacgatg gcctttacca ggtctcagt acagccacca aggacaccta cgacgcctt 1620
 cacatgcagg ccctgcccc tcgctaa 1647

<210> 14
 <211> 1455
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>

5

ES 2 696 000 T3

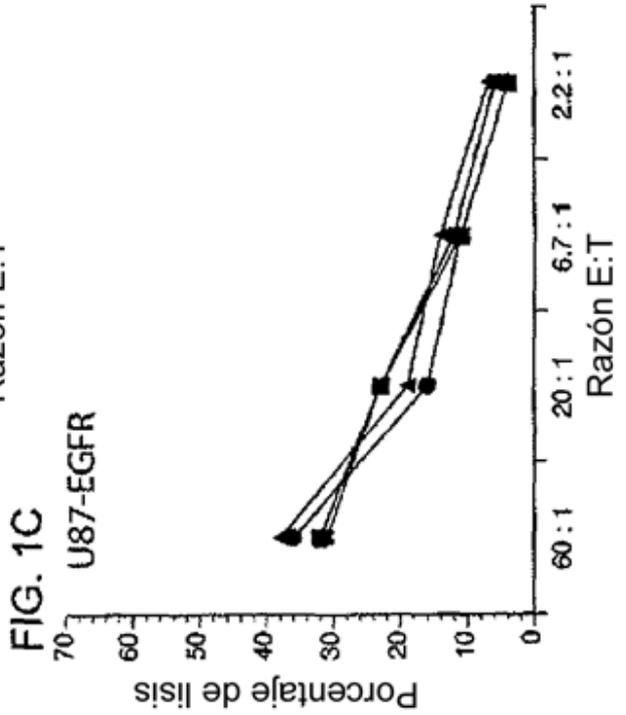
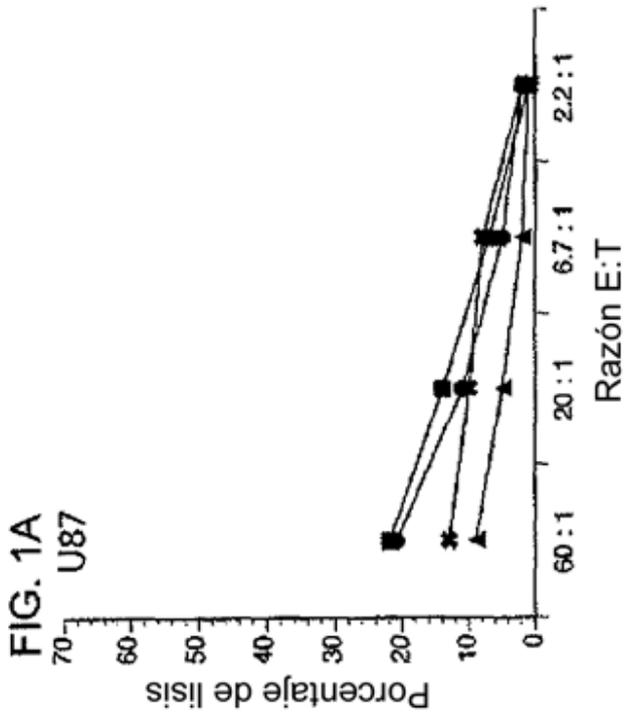
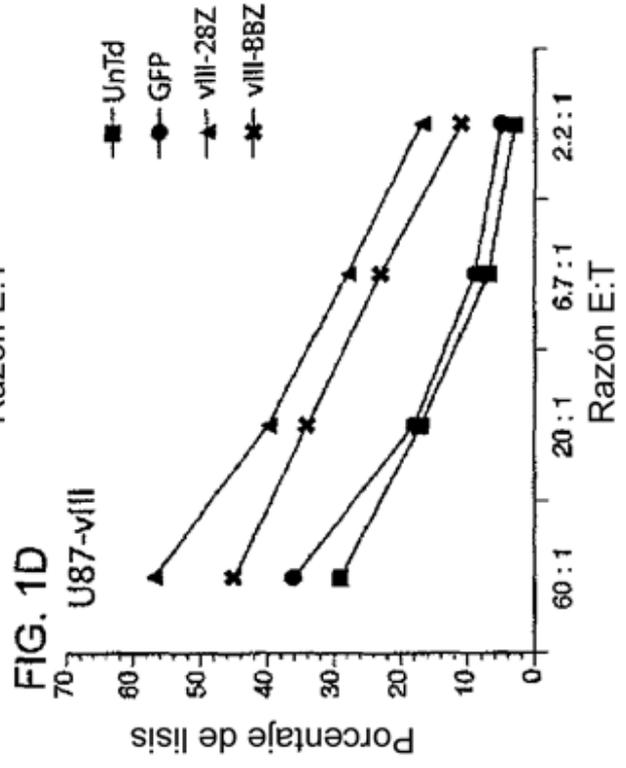
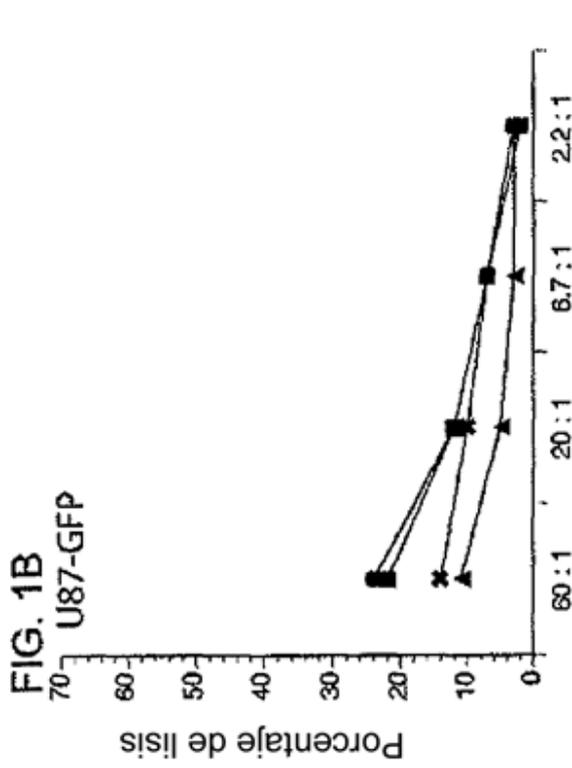
<223> Sintética

<400> 14

atggttctgc	tggtcaccag	cctgctgctg	tgcgaaactgc	cccaccccgc	ctttctgctg	60
atccccgaca	tccagatgac	ccagagccct	agcagcctga	gcgccagcgt	ggggcgacaga	120
gtgaccatca	cctgtcgggc	cagccagggc	atcagaaaca	acctggcctg	gtatcagcag	180
aagccccgca	aggcccccaa	gagactgatc	tacgctgcca	gcaatctgca	gagcggcgtg	240
cccagcagat	tcaccggaag	cggctccggc	accgagttca	ccctgatcgt	gtccagcctg	300
cagccccgag	acttcgccac	ctactactgc	ctgcagcacc	acagctaccc	tctgaccagc	360
ggcggaggca	ccaaggtgga	gatcaagcgg	accggcagca	ccagcggcag	cggcaagcct	420
ggcagcggcg	agggaaagcga	ggtccagggt	ctggaatctg	gcggcggact	ggtgcagcct	480
ggcggcagcc	tgagactgag	ctgtgccgcc	agcggcttca	ccttcagcag	ctacgccatg	540
tcttgggctc	ggcaggctcc	tggaaagggc	ctggaatggg	tgtccgccat	cagcggctct	600
ggcggctcca	ccaactacgc	cgacagcgtg	aagggccggg	tcaccatcag	ccgggacaac	660
agcaagaaca	ccctgtatct	gcagatgaac	agcctgagag	ccgaggacac	cgccgtgtac	720
tactgtgccg	gcagcagcgg	gtggagcgag	tactggggcc	agggcacact	ggtcacagtg	780
tctagcgcgg	ccgcaattga	agttatgtat	cctcctcctt	acctagacaa	tgagaagagc	840
aatggaacca	ttatccatgt	gaaagggaaa	cacctttgtc	caagtcccct	atctcccgga	900
ccttctaagc	ccttttggtg	gctggtggtg	ggtggtggag	tcctggcttg	ctatagcttg	960
ctagtaacag	tggcctttat	tatcttctgg	gtgaggagta	agaggagcag	gctcctgcac	1020
agtgactaca	tgaacatgac	tccccgccgc	cccgggcca	cccgcaagca	ttaccagccc	1080
tatgccccac	cacgcgactt	cgcagcctat	cgctccagag	tgaagttcag	caggagcgc	1140
gacgcccccg	cgtaccagca	gggccagaac	cagctctata	acgagctcaa	tctaggacga	1200
agagaggagt	acgatgtttt	ggacaagaga	cgtggccggg	accctgagat	ggggggaaag	1260
ccgagaagga	agaaccctca	ggaaggcctg	tacaatgaac	tgcagaaaga	taagatggcg	1320
gaggcctaca	gtgagattgg	gatgaaaggc	gagcgcggga	ggggcaaggg	gcacgatggc	1380
ctttaccagg	gtctcagtac	agccaccaag	gacacctacg	acgcccttca	catgcaggcc	1440
ctgccccctc	gctaa					1455

REIVINDICACIONES

1. Receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a antígeno contra la variante III de receptor de factor de crecimiento epidérmico, un dominio bisagra extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización de células T intracelular, en el que el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 2, preferiblemente en el que el dominio de unión a antígeno comprende:
 - (a) un péptido ligador que comprende SEQ ID NO: 3;
 - (b) una secuencia líder que comprende SEQ ID NO: 4; y/o
 - (c) SEQ ID NO: 5.
2. CAR según la reivindicación 1, que comprende además un dominio bisagra intracelular.
3. CAR según la reivindicación 1 o 2, en el que el dominio bisagra extracelular y el dominio transmembrana comprenden el dominio bisagra extracelular de CD8 humano y el dominio transmembrana (SEQ ID NO: 6).
4. CAR según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el dominio de señalización de células T intracelular comprende dominios de señalización de células T intracelulares de CD28, 4-1BB y CD3 ζ humanos (SEQ ID NO: 7).
5. CAR según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el dominio bisagra extracelular, dominio transmembrana y dominio de señalización de células T intracelular comprenden dominios bisagra extracelulares, transmembrana y de señalización de células T intracelulares de CD28 humano (SEQ ID NO: 8) y dominio de señalización de células T intracelular de CD3 ζ humano (SEQ ID NO: 9).
6. CAR según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 10-11.
7. Ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el CAR según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
8. Ácido nucleico según la reivindicación 7, que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 12-14.
9. Vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 7 u 8.
10. Célula huésped aislada que comprende el vector de expresión recombinante según la reivindicación 9.
11. Población de células que comprende al menos una célula huésped según la reivindicación 10.
12. Composición farmacéutica que comprende el CAR según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, el ácido nucleico según la reivindicación 7 u 8, el vector de expresión recombinante según la reivindicación 9, la célula huésped según la reivindicación 10 o la población de células según la reivindicación 11, y un portador farmacéuticamente aceptable.
13. Método de detección de la presencia de cáncer en un huésped, que comprende:
 - (a) poner en contacto una muestra que comprende una o más células del huésped con el CAR según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, la célula huésped según la reivindicación 10 o la población de células según la reivindicación 11, formando de ese modo un complejo, y
 - (b) detectar el complejo, en el que la detección del complejo es indicativa de la presencia de cáncer en el huésped.
14. CAR según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, ácido nucleico según la reivindicación 7 u 8, vector de expresión recombinante según la reivindicación 9, célula huésped según la reivindicación 10, población de células según la reivindicación 11 o composición farmacéutica según la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer en un huésped.



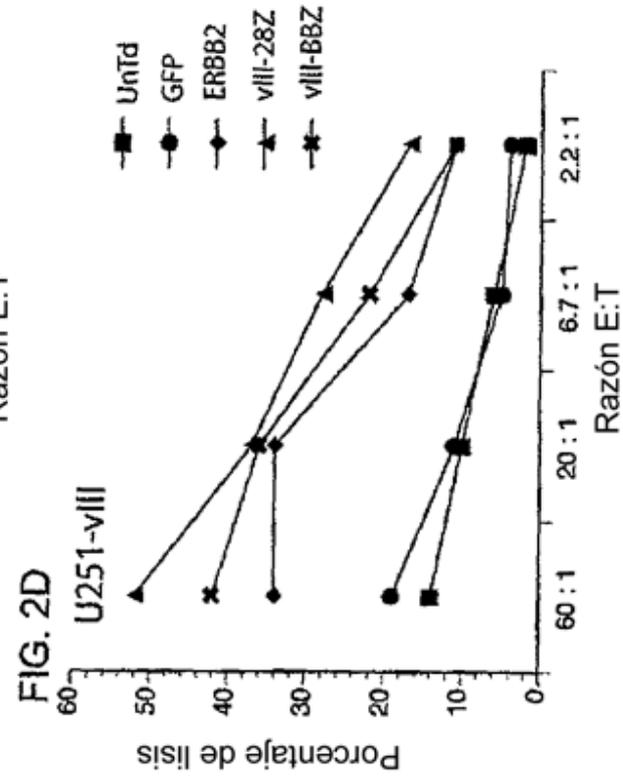
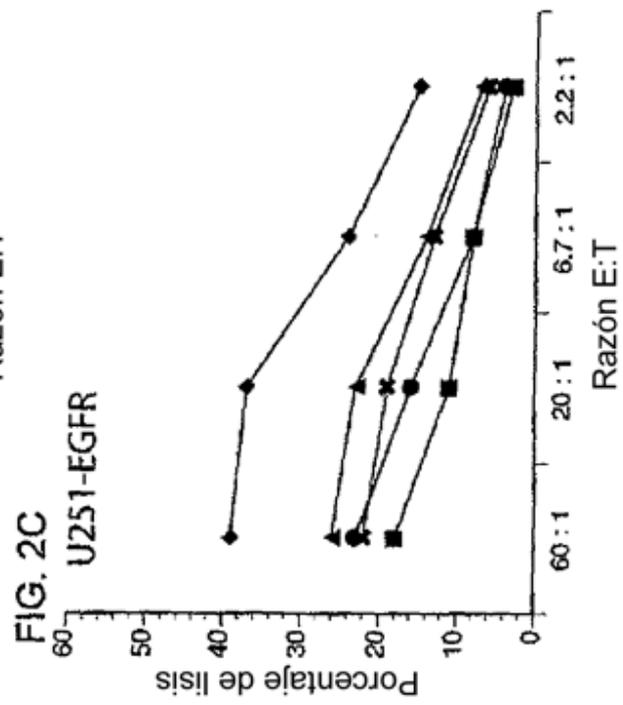
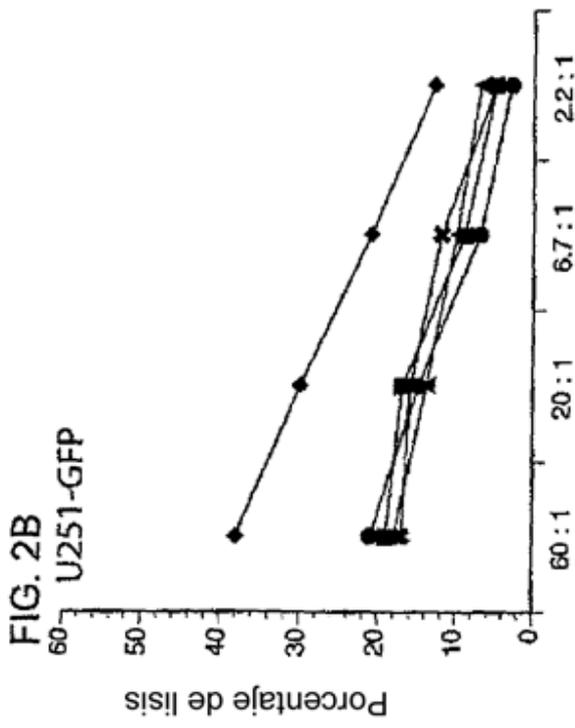
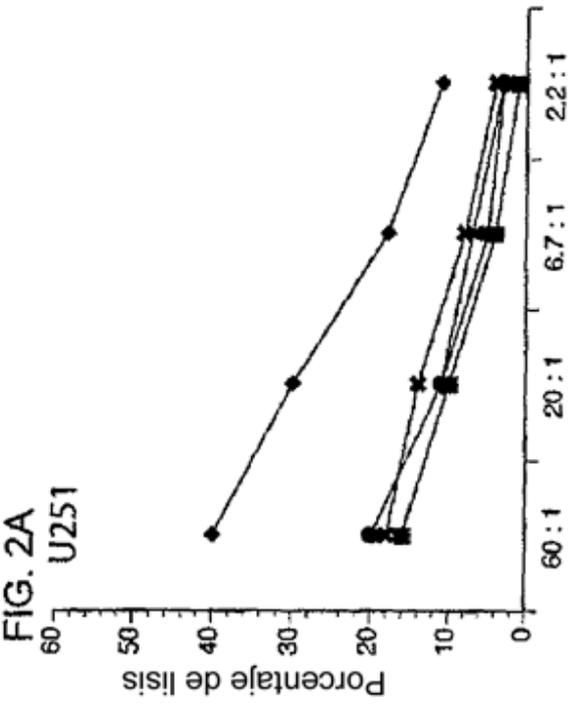


Figura 3A

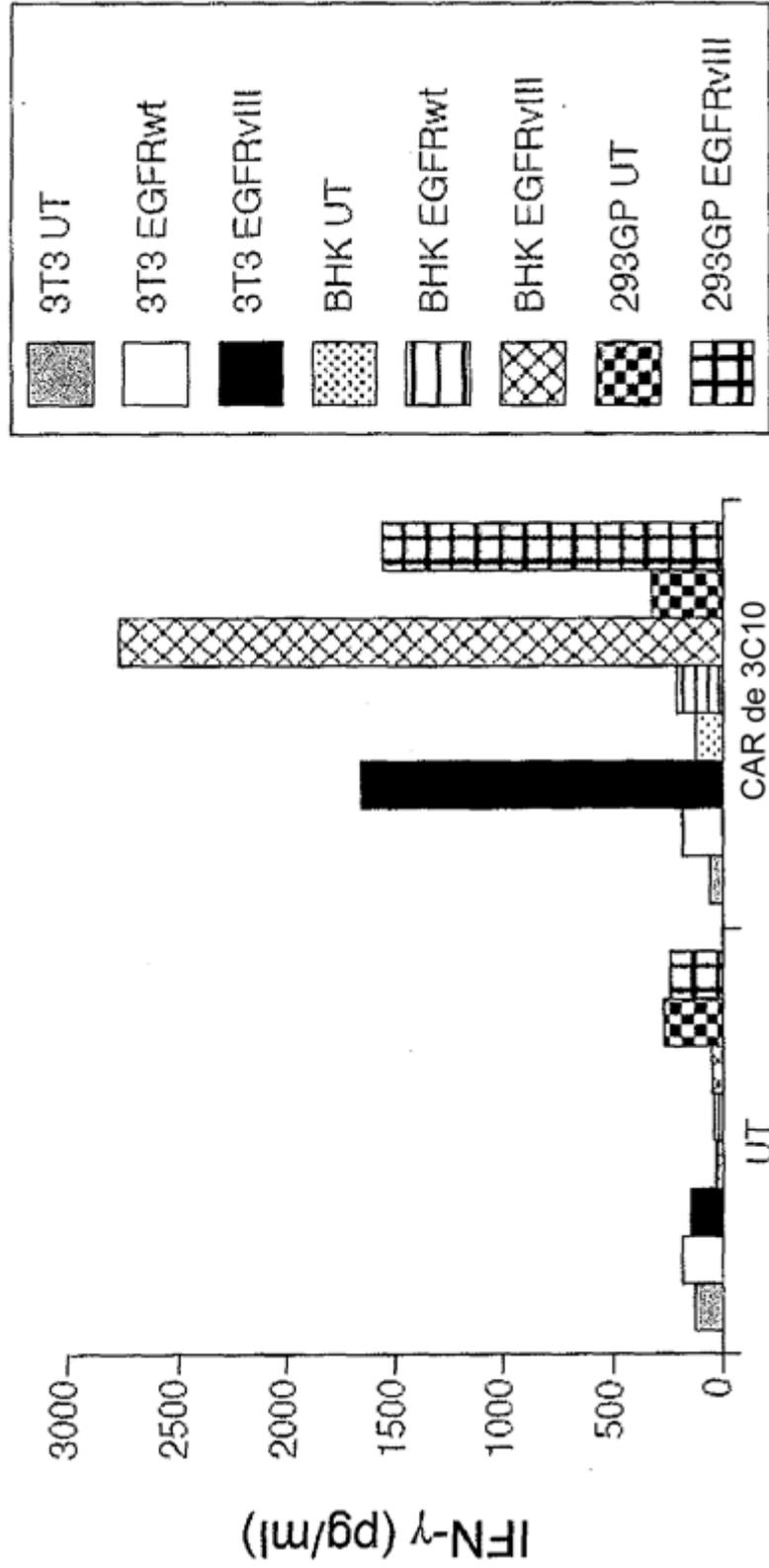


Figura 3B

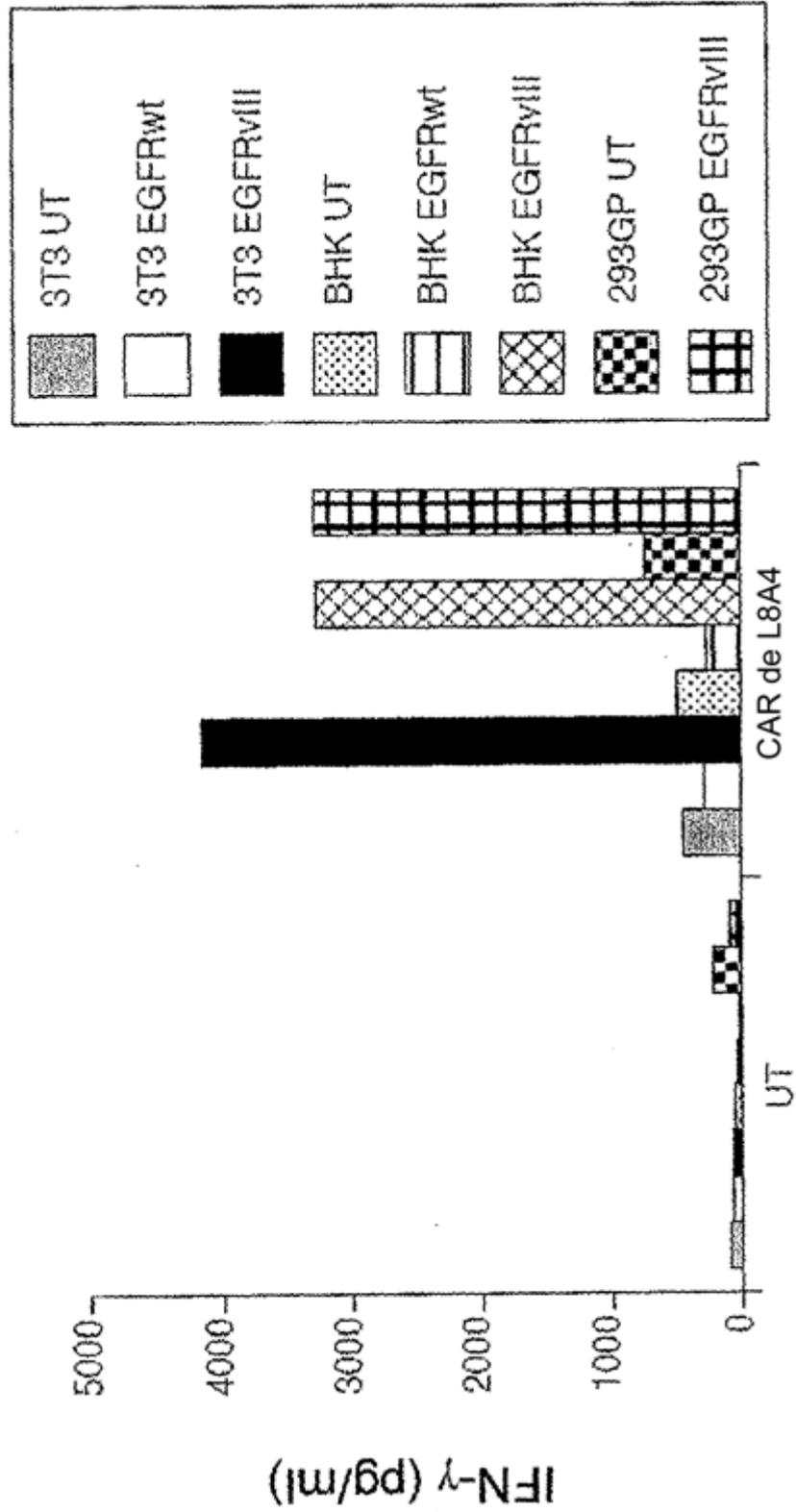


Figura 3C

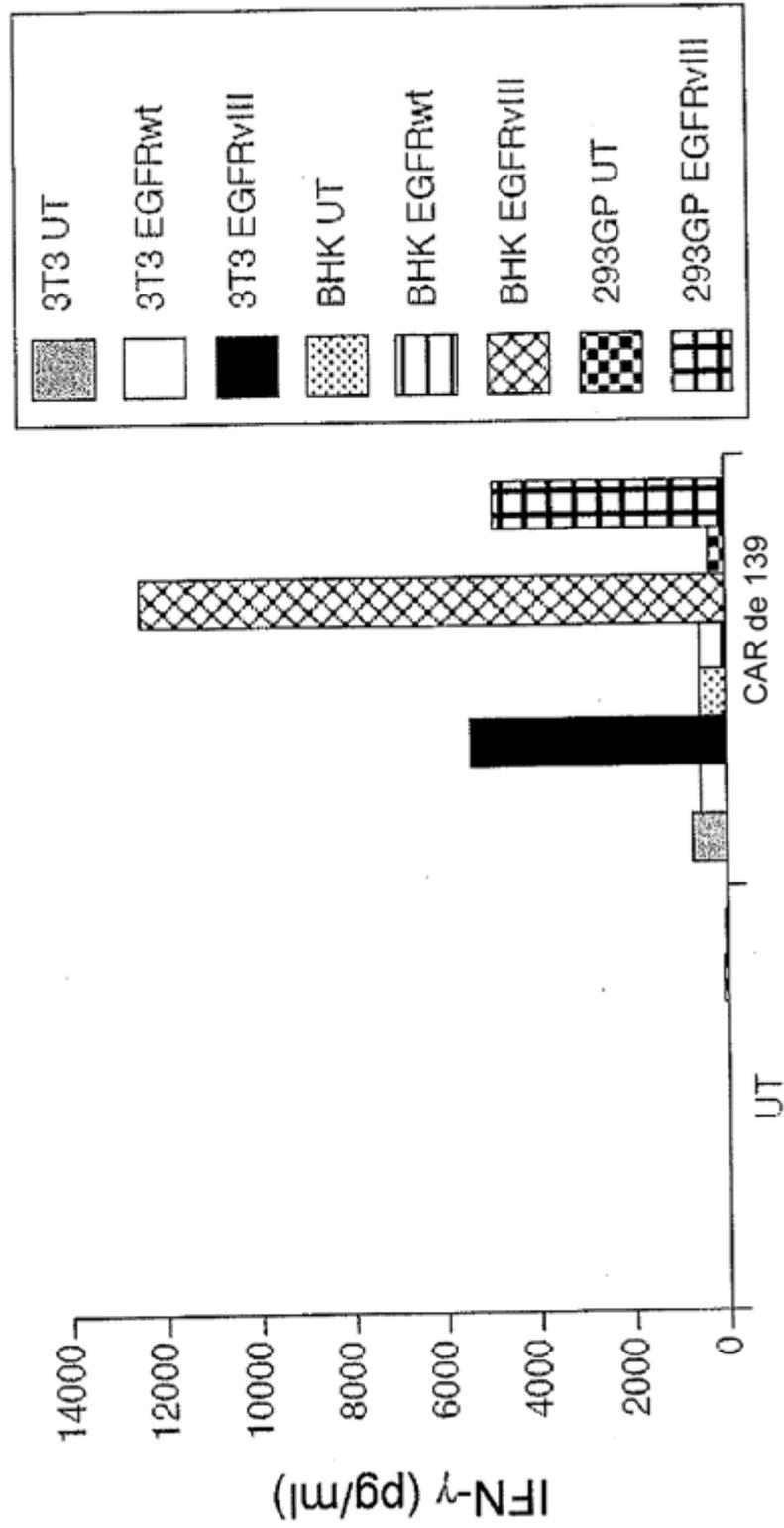


Figura 4

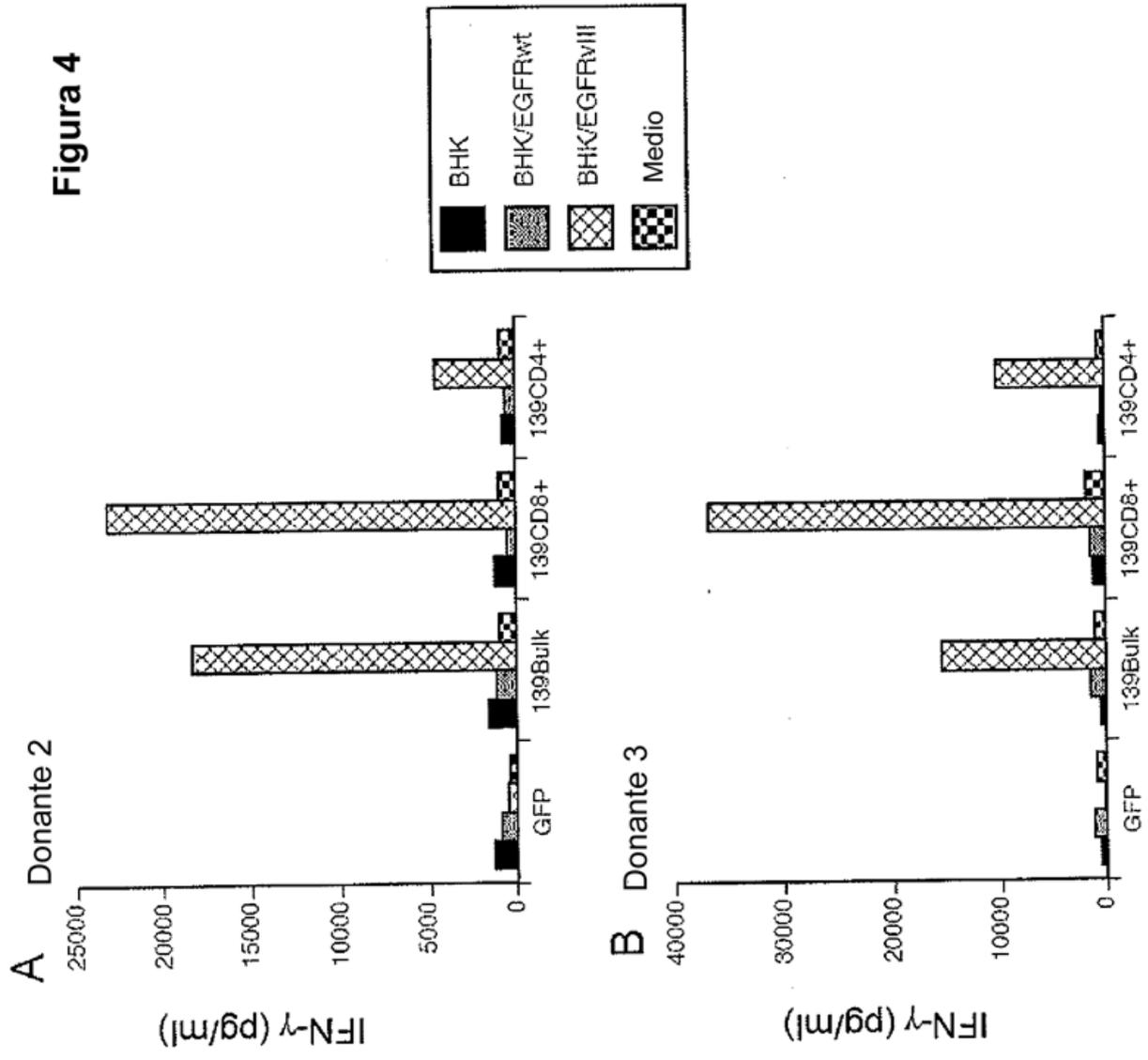


Figura 5

