

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 966**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2011 E 17153799 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 3214091**

54 Título: **Utilización de linfocitos T modificados con receptores de antígeno quiméricos para tratar el cáncer**

30 Prioridad:

09.12.2010 US 421470 P

29.06.2011 US 201161502649 P

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

20.02.2019

73 Titular/es:

THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (100.0%)

Center for Technology Transfer, 3160 Chestnut Street, Suite 200

Philadelphia PA 19104-6283, US

72 Inventor/es:

JUNE, CARL H.;

LEVINE, BRUCE L.;

PORTER, DAVID L.;

KALOS, MICHAEL D. y

MILONE, MICHAEL C.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 700 966 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

Utilización de linfocitos T modificados con receptores de antígeno quiméricos para tratar el cáncer

5 Antecedentes de la invención

La gran mayoría de pacientes que tienen neoplasias malignas de linfocitos B, incluyendo la leucemia linfocítica crónica (LLC), morirán por la progresión de su enfermedad. Una aproximación para tratar a estos pacientes es modificar genéticamente los linfocitos T para detectar los antígenos expresados en células tumorales mediante la expresión de receptores de antígeno quiméricos (CAR). Los CAR son receptores de antígenos que están diseñados para reconocer antígenos de superficie celular en una manera independiente del antígeno leucocitario humano. Los intentos de utilizar células modificadas genéticamente que expresan CAR para tratar a estos tipos de pacientes han tenido un éxito muy limitado. Véase, por ejemplo, Brentjens et al., 2010, Molecular Therapy, 18: 4, 666 - 668; Morgan et al., 2010, Molecular Therapy, publicado en línea el 23 de febrero de 2010, páginas 1-9; y Till et al., 2008, Blood, 112: 2261-2271.

En la mayoría de los cánceres, los antígenos específicos del tumor no están todavía bien definidos, pero en los tumores malignos de linfocitos B, CD 19 es una diana tumoral atractiva. La expresión de CD 19 está restringida a linfocitos B normales y malignos (Uckun, et al., Blood, 1988, 71: 13-29), de modo que CD 19 es una diana ampliamente aceptada para probar de manera segura los CAR. Mientras que los CAR pueden desencadenar la activación de los linfocitos T de una manera similar a un receptor endógeno de linfocitos T, un impedimento importante para la aplicación clínica de esta tecnología hasta la fecha ha sido limitado por la expansión in vivo de los linfocitos T CAR+, la rápida desaparición de las células después de la infusión, y una actividad clínica decepcionante (Jena, et al., Blood, 2010, 116: 1035 - 1044, Uckun, et al., Blood, 1988, 71: 13 - 29).

La publicación de solicitud de patente US nº 20040043401 describe receptores de linfocitos T quiméricos que combinan en una única especie quimérica, el dominio intracelular de la cadena CD3 zeta, una región de señalización de una proteína coestimuladora tal como CD28 y un elemento de unión. Milone et al., 2009, Molecular Therapy, 17: 8, 1453-1464 describen linfocitos T con receptores de antígeno quiméricos que contienen dominios de transducción de señales de CD137.

Por lo tanto, existe una necesidad urgente en la técnica de composiciones y métodos para el tratamiento de cáncer usando CAR que puedan expandirse in vivo. La presente invención satisface esta necesidad.

35 Resumen de la invención

La presente descripción proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en el que el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta, en donde el dominio de señalización CD3 zeta comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. Nº: 24.

Los aspectos de la invención para los que se busca protección son como los que se definen en las reivindicaciones.

En un primer aspecto de la invención se proporciona un linfocito T genéticamente modificado para expresar un CAR en el que el CAR comprende (a) un dominio de unión al antígeno que es un scFv anti-CD19 (b) una región de señalización coestimuladora 4-1BB, y (c) un dominio de señalización CD3 zeta para uso en un método para tratar el cáncer en un ser humano, en el que el scFv anti-CD19 comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. Nº: 20 y/o el dominio de señalización CD3 zeta comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. Nº: 24, y en el que el ser humano es resistente por lo menos a un agente quimioterapéutico. El cáncer puede comprender un tumor no sólido tal como un tumor hematológico. El cáncer puede ser una leucemia o linfoma. La leucemia puede ser:

- (i) una leucemia aguda o una leucemia crónica; o
- (ii) una leucemia linfocítica aguda.

Alternativamente, el cáncer puede ser:

- (i) leucemia linfocítica aguda pre-B (indicación pediátrica), leucemia linfocítica aguda en adultos, linfoma de células del manto o linfoma difuso de linfocitos B grandes;
- (ii) linfoma no Hodgkin;
- (iii) mieloma múltiple; o
- (iv) enfermedad de Hodgkin.

65 En una realización de este aspecto de la invención el cáncer es una leucemia linfocítica crónica.

En un segundo aspecto de la invención se proporciona un linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR en el que el CAR comprende (a) un dominio de unión al antígeno que es un scFv anti-CD 19 (b) una región de señalización coestimuladora 4-1BB, y (c) un dominio de señalización CD3 zeta para utilizar en un método para tratar el cáncer que comprende administrar dicho linfocito T, a un humano diagnosticado con cáncer, en el que el scFv anti-CD19 comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 20 o el dominio de señalización CD3 zeta comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 24, y en el que dicho método genera una población de linfocitos T genéticamente modificados que persiste en el ser humano durante al menos ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, dos años o tres años después de la administración y en donde el ser humano es resistente por lo menos a un agente quimioterapéutico.

La población persistente de linfocitos T modificados genéticamente puede comprender al menos una célula seleccionada del grupo que consiste en un linfocito T que se administró al ser humano, una progenie de un linfocito T que se administró al ser humano y una combinación de los mismos. La población persistente de linfocitos T modificados genéticamente puede comprender un linfocito T de memoria.

En un tercer aspecto de la invención se proporciona un linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR en el que el CAR comprende (a) un dominio de unión al antígeno que es un scFv anti-CD 19 (b) una región de señalización coestimuladora 4-1BB, y (c) un dominio de señalización CD3 zeta para utilizar en un método para tratar cáncer que comprende administrar dicho linfocito T a un ser humano diagnosticado con cáncer, en el que el scFv anti-CD19 comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 20 o el dominio de señalización CD3 zeta comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 24, y en el que dicho método expande una población de linfocitos T modificados genéticamente en humanos, y en el que el ser humano es resistente por lo menos a un agente quimioterapéutico.

La progenie de linfocitos T en el ser humano pueden comprender un linfocito T de memoria. La población de progenie de linfocitos T puede persistir en el ser humano durante al menos tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, dos años o tres años después de la administración.

En aspectos de la invención relativos a un linfocito T para su uso tal como se ha definido anteriormente, el cáncer puede ser como se define en el primer aspecto o el cáncer puede ser una leucemia linfocítica crónica.

En aspectos de la invención relativos a un linfocito T para su uso tal como se ha definido anteriormente, el ser humano puede tener una leucemia linfocítica crónica que es una leucemia CD19+ refractaria y un linfoma.

En cualquier aspecto de la invención, el linfocito T puede ser una célula autóloga o alogénica. La célula puede administrarse después de terapia ablativa de linfocitos B, tal como con agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan.

En aspectos de la invención relativos a un linfocito T para su uso tal como se ha definido anteriormente, la célula puede administrarse en una composición farmacéutica a una dosificación de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal o 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal.

De acuerdo con una realización de la invención, el linfocito T a utilizar, puede ser como se ha definido anteriormente en el que:

(i) la región de señalización coestimuladora 4-1BB comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 23;

(ii) el CAR comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de Sec. N°: 12;

(iii) el scFv anti-CD19 puede codificarse mediante la Id. de Sec. N°: 14;

(iv) la región de señalización 4-1BB está codificada por Id. de Sec. N°: 17 y el dominio de señalización CD3 zeta está codificado por Id. de Sec. N°: 18;

(v) el scFv anti-CD 19 está codificado por Id. de Sec. N°: 14, la región de señalización 4-1BB está codificada por Id. de Sec. N°: 17 y el dominio de señalización CD3 zeta está codificado por Id. de Sec. N°: 18; o

(vi) el CAR está codificado por la secuencia de ácido nucleico expuesta en la Id. de Sec. N°: 8.

También se describe aquí una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR que comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 12.

También se describe aquí una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR que comprende la secuencia de ácido nucleico de Id. de Sec. N°: 8.

También se describe aquí que un dominio de señalización de CD3 zeta en el CAR que está codificado por la secuencia de ácido nucleico de Id. de Sec. N°: 18.

También se describe aquí un CAR aislado que comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta, en el que el dominio de señalización CD3 zeta comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 24.

5 También se describe aquí una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR, en el que el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 24.

10 Como se describe en el presente documento, la célula que comprende el CAR presenta una inmunidad antitumoral cuando el dominio de unión al antígeno del CAR se une a su antígeno correspondiente.

También se describe aquí un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR, en el que el CAR comprende un dominio de unión al antígeno, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta, en el que el dominio de señalización CD3 zeta comprende la secuencia de aminoácidos de la Id. de Sec. N°: 24.

15 También se describe aquí un método para estimular una respuesta inmune mediada por linfocitos T a una población de células diana o tejido en un mamífero. En una realización, el método comprende administrar a un mamífero una cantidad eficaz de una célula genéticamente modificada para expresar un CAR en el que el CAR comprende un dominio de unión al antígeno, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 24, en el que el dominio de unión al antígeno se selecciona para reconocer específicamente la población de células o tejido diana.

20 También se describe un método para proporcionar una inmunidad antitumoral en un mamífero. También se describe un método que comprende administrar a un mamífero una cantidad eficaz de una célula genéticamente modificada para expresar un CAR en el que el CAR comprende un dominio de unión al antígeno, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 24, proporcionando así una inmunidad antitumoral en el mamífero.

25 También se describe un método para tratar un mamífero que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociada con una expresión elevada de un antígeno tumoral. También se describe un método que comprende administrar a un mamífero una cantidad eficaz de una célula genéticamente modificada para expresar un CAR en el que el CAR comprende un dominio de unión al antígeno, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 24, tratando con ello al mamífero.

Tal como se describe en el presente documento, la célula es un linfocito T autólogo.

30 Como se describe aquí, los antígenos tumorales incluyen CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, glicolípidio F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR, y cualquier combinación de los mismos.

35 También se describe aquí un método para tratar a un ser humano con leucemia linfocítica crónica. En una realización, el método comprende administrar a un humano un linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR en el que el CAR comprende un dominio de unión al antígeno, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 24.

40 Tal como se describe en el presente documento, el ser humano es resistente por lo menos a un agente quimioterapéutico

Tal como se describe en el presente documento, la leucemia linfocítica crónica es una leucemia CD19+ refractaria y un linfoma.

45 También se describe aquí un método para generar una población persistente de linfocitos T modificados genéticamente en un ser humano diagnosticado con cáncer. También se describe aquí un método que comprende administrar a un ser humano un linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR en el que el CAR comprende un dominio de unión al antígeno, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 24, en el que la población persistente de linfocitos T modificados genéticamente persiste en el ser humano durante al menos un mes después de la administración.

50 Tal como se describe en el presente documento, la población persistente de linfocitos T modificados genéticamente comprende al menos una célula seleccionada del grupo que consiste en un linfocito T que se

administró al ser humano, una progenie de un linfocito T que se administró al ser humano y una combinación de los mismos.

5 Tal como se describe en el presente documento, la población persistente de linfocitos T modificados genéticamente comprende un linfocito T de memoria.

10 Tal como se describe en el presente documento, la población persistente de linfocitos T modificados genéticamente persiste en el ser humano durante al menos tres meses después de la administración. Como se describe en el presente documento, la persistencia de la población de linfocitos T modificados genéticamente persiste en el ser humano durante al menos cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, dos años o tres años después de la administración.

Tal como se describe en el presente documento, se trata la leucemia linfocítica crónica.

15 También se describe aquí un método para expandir una población de linfocitos T modificados genéticamente en un ser humano diagnosticado con cáncer. También se describe aquí un método que comprende administrar a un ser humano un linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR en el que el CAR comprende un dominio de unión al antígeno, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 24, en la que el linfocito T genéticamente modificado administrado produce una población de linfocitos T de progenie en el ser humano.

Tal como se describe en el presente documento, los linfocitos T de progenie en el ser humano comprenden un linfocito T de memoria.

25 Tal como se describe en el presente documento, el linfocito T es un linfocito T autólogo.

Tal como se describe en el presente documento, el ser humano es resistente por lo menos a un agente quimioterapéutico.

30 Como se describe aquí, el cáncer es una leucemia linfocítica crónica. En otra realización, la leucemia linfocítica crónica es una leucemia CD19+ refractaria y un linfoma.

35 Tal como se describe en el presente documento, la población de linfocitos T de progenie persiste en el ser humano durante al menos tres meses después de la administración. Como se describe en el presente documento, la población de linfocitos T de progenie persiste en el ser humano durante al menos cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, dos años o tres años después de la administración.

Tal como se describe en el presente documento, se trata el cáncer.

40 Breve descripción de los dibujos

45 La siguiente descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención se comprenderá mejor cuando se lea conjuntamente con los dibujos adjuntos. Con el fin de ilustrar la invención, se muestran en los dibujos realizaciones que son preferidas. Debe entenderse, sin embargo, que la invención no está limitada a las disposiciones e instrumentalidades exactas de las realizaciones mostradas en los dibujos.

50 La Figura 1, que comprende las Figuras 1A a 1C, es una serie de imágenes de las representaciones esquemáticas del vector de transferencia génica y transgén, fabricación de linfocitos T genéticamente modificados y diseño del protocolo clínico. La Figura 1A representa los vectores lentivirales y el transgén que muestran los elementos funcionales principales. Se produjo un vector lentiviral de grado clínico pseudotipado de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (denominado pELPs 19BBz) dirigiendo la expresión del scFv anti-CD19 derivado del anticuerpo monoclonal murino FMC63, la bisagra CD8 α humana y el dominio transmembrana y los dominios humanos de señalización 4-1BB y CD3zeta. La expresión constitutiva del transgén se dirigió por la inclusión de un EF-1 α (promotor del factor de elongación-1 α); LTR, repetición terminal larga; RRE, elemento de respuesta a rev, (cPPT) y la secuencia de terminación central (CTS). La figura no está a escala. La Figura 1B representa la fabricación de linfocitos T. Las células autólogas se obtuvieron a través de una aféresis, y los linfocitos T se enriquecieron mediante elutriación de células mononucleares, se lavaron y se redujeron las células de leucemia residual mediante la adición de cuentas paramagnéticas recubiertas con anti-CD3/CD28 para la selección positiva y la activación de linfocitos T. Se añadió el vector lentiviral en el momento de la activación celular y se lavó el día 3 después de la iniciación del cultivo. Las células se expandieron sobre un dispositivo de plataforma basculante (WAVE Bioreactor System) durante 8-12 días. En el último día de cultivo, las cuentas se retiraron al pasar sobre un campo magnético y los linfocitos T CART19 se recogieron y crioconservaron en medio infusible. La Figura 1C ilustra el diseño del protocolo clínico. A los pacientes se les administró quimioterapia de linfoplastia como se describió, seguida por la infusión n° 1 de CART19 por vía i.v. flujo de gravedad por goteo en un período de 15-20 minutos. La infusión se administró usando un enfoque de

dosis dividida durante 3 días (10%, 30%, 60%) comenzando entre 1 y 5 días después de completar la quimioterapia. Los ensayos de valoración se llevaron a cabo en la semana de estudio 4. Al final de la supervisión activa, los sujetos fueron transferidos a un protocolo de destino para el seguimiento a largo plazo de acuerdo con la guía de la FDA.

La Figura 2, que comprende las Figuras 2A a 2F, es una serie de imágenes que demuestran una expansión y persistencia in vivo sostenida en sangre y médula de células CART19. El ADN aislado de sangre completa como se representa en la Figura 2A a 2C o la médula ósea como se representa en la Figura 2D a 2F, las muestras obtenidas de UPN 01 como se representa en la Figura 2A y 2D, UPN 02 como se representa en la Figura 2B y 2E y UPN 03 como se representa en la Figura 2C y 2F se sometieron a análisis de Q-PCR usando un ensayo calificado para detectar y cuantificar las secuencias de CART19. Cada punto de datos representa el promedio de mediciones triplicadas en ADN genómico de 100-200 ng, con un porcentaje máximo de CV inferior al 1,56%. Los parámetros de acierto/ fallo para el ensayo incluían rangos preestablecidos de pendiente y eficiencia de amplificación, y amplificación de una muestra de referencia. El límite inferior de cuantificación para el ensayo establecido por el intervalo de la curva estándar era 2 copias de transgén/microgramo de ADN genómico; los valores de muestra por debajo de ese número se consideran estimaciones y se presentan si al menos 2/3 de las repeticiones generan un valor Ct con % CV para los valores 15%. Las células CART19 se infundieron en los días 0, 1 y 2 para UPN 01 y UPN 03 y los días 0, 1, 2 y 11 para UPN 02.

La Figura 3, que comprende las Figuras 3A a 3D, es una serie de imágenes que muestran las citoquinas de médula ósea y suero antes y después de la infusión de linfocitos T CAR; las mediciones longitudinales de los cambios en las citoquinas séricas, quimioquinas y receptores de citoquinas en UPN 01 como se muestra en la Figura 3A, UPN 02 como se representa en la Figura 3B y UPN 03 como se representa en la Figura 3C, en el día indicado después de la infusión celular CART19 y valoraciones en serie de los mismos analitos en la médula ósea de UPN 03 como se muestra en la figura 3D. Las muestras se sometieron a análisis multiplex utilizando la tecnología Luminex bead array y equipos multiplexa premontados y validados. Los analitos con un cambio de ≥ 3 veces se indican y se representan gráficamente como cambio relativo desde la línea de base como se representa en la figura 3A a 3C o como valores absolutos como se representa en la figura 3D. Los valores absolutos para cada analito en cada punto de tiempo se derivaron de una curva estándar basada en proteína recombinante sobre una dilución en serie de 8 puntos en 3 veces, con límites superiores e inferiores de cuantificación (ULOQ, LLOQ) determinados por el 80-120% de los valores de corte observados/esperados para las curvas estándar. Cada muestra se evaluó por duplicado con valores medios calculados y % CV en la mayoría de los casos inferior al 10%. Para acomodar la presentación de datos consolidados en el contexto del amplio rango para los valores absolutos, los datos se presentan como cambios del número de veces sobre el valor de referencia para cada analito. En los casos en que los valores basales no eran detectables, la mitad del valor de la curva estándar más baja se utilizó como valor de referencia. Los intervalos de curva estándar para los analitos y valores basales (día 0) (enumerados entre paréntesis secuencialmente para UPN01, 02 y 03), todos en pg/ml: IL1-R α : 35,5-29,318 (689, 301, 287); IL-6: 2,7-4,572 (7, 10,1, 8,7); IFN- γ : 11,2-23,972 (2,8, ND, 4,2); CXCL10: 2,1-5,319 (481, 115, 287); MIP-1 β : 3,3-7,233 (99,7, 371, 174); MCP-1: 4,8-3,600 (403, 560, 828); CXCL9: 48,2-3,700 (1,412, 126, 177); IL2-R α : 13,4-34,210 (4,319, 9,477, 610); IL-8: 2,4-5,278 (15,3, 14,5, 14,6); IL-10: 6,7-13,874 (8,5, 5,4, 0,7); MIP-1 α : 7,1-13,778 (57,6, 57,3, 48,1).

La Figura 4, que comprende las Figuras 4A a 4D, es una serie de imágenes que representan la expresión prolongada de CART19 en superficie y el establecimiento funcional de CAR de memoria in vivo. La Figura 4A representa la detección de linfocitos CD3+ que expresan CAR y la ausencia de linfocitos B en la periferia y la médula. Las células recién procesadas de sangre periférica o de médula ósea obtenidas de UPN 03 al día 169 después de la infusión de células CART19 se evaluaron por citometría de flujo para la expresión superficial de CAR19 (parte superior) o presencia de linfocitos B (parte inferior); como control, las CMSP obtenidas de un donante sano ND365 se tiñeron. Para evaluar la expresión de CAR19 en los linfocitos CD3+, las muestras fueron cotiñidas con anticuerpos contra CD14-PE-Cy7 y CD16-PE-Cy7 (canal de descarte) y CD3-FITC, seleccionado positivamente por CD3+, y se evaluó la expresión de CAR19 en los compartimentos de linfocitos CD8+ y CD8- mediante cotiñición con CD8a-PE y el anticuerpo de idiotipo anti-CAR19 conjugado con Alexa-647. Los datos en las gráficas están seleccionados en la población de células negativas al canal de descarte/ CD3-positivas. Para evaluar la presencia de linfocitos B, se cotiñeron las muestras con anticuerpos para CD14-APC y CD3-FITC (canales de descarte) y se evaluó la presencia de linfocitos B en la fracción negativa del canal de descarte mediante cotiñición con anticuerpos contra CD20-PE y CD19-PE-Cy-7. En todos los casos, los cuadrantes de selección negativos se establecieron en controles sin tinción como se representa en las Figuras 4B y 4C. Se muestra la inmunofenotipificación de linfocitos T de subconjuntos de linfocitos T CD4+ (Figura 4B) y CD8+ (Figura 4C). Las muestras de sangre periférica congeladas de UPN 03 obtenidas por aféresis a los días 56 y 169 después de la infusión de linfocitos T reposaron durante la noche en medio de cultivo sin factores añadidos, se lavaron y se sometieron a inmunofenotipificación multiparamétrica para la expresión de marcadores de linfocitos T de memoria, y agotamiento. La estrategia de bloqueo, como se representa en la Figura 8, implicó un bloqueo inicial en células CD3-positivas y canal de descarte (CD14, CD16, Live/Dead Aqua) negativas, seguido de selecciones positivas en células CD4+ y CD8+. Las selecciones y los cuadrantes se establecieron usando controles de FMO (CAR, CD45RA, PD-1, CD25, CD127, CCR7) o seleccionando poblaciones de células positivas (CD3, CD4, CD8) y subgrupos claramente delineados (CD27, CD28, CD57); los

datos se mostraron después de la transformación biexponencial para la visualización objetiva de los eventos. La figura 4D muestra la capacidad funcional de las células CAR persistentes. Las muestras de sangre periférica congeladas de UPN 03 obtenidas por aféresis a los días 56 y 169 después de la infusión de linfocitos T reposaron durante la noche en medio de cultivo sin factores añadidos, se lavaron y se evaluaron directamente ex vivo para la capacidad de reconocer células diana que expresan CD19 usando ensayos de desgranulación de CD107. Después de una incubación de dos horas en presencia de anti-CD28, anti-CD49d y CD107-FITC, se recogieron las mezclas de células, se lavaron y se sometieron a un análisis citométrico de flujo multiparamétrico para evaluar la capacidad de las células CART19 de desgranular en respuesta a las dianas que expresan CD19. La estrategia de selección implicó una selección inicial en células CD3-PE-positivas y canales de descarte (CD14-PE-Cy7, CD16-PE-Cy7, Live/Dead Aqua) negativas, seguido por selección en células CD8-PE-Texas Red positivas; los datos presentados corresponden a la población seleccionada por CD8+. En todos los casos, se establecieron cuadrantes de selección negativa en controles no teñidos.

La Figura 5, que comprende las Figuras 5A a 5C, es una serie de imágenes que representan los resultados de experimentos que evalúan respuestas clínicas después de la infusión de células CART19. La Figura 5A muestra que UPN 02 se trató con dos ciclos de rituximab y bendamustina con una respuesta mínima (R/B, flecha). Los linfocitos T CART19 se infundieron comenzando 4 días después de bendamustina solamente (B, flecha). El rituximab y la leucemia resistente a bendamustina se eliminaron rápidamente de la sangre, como se indica por una disminución en el recuento absoluto de linfocitos (ALC) de 60.600/ml a 200/ml dentro de los 18 días de la infusión. El tratamiento con corticosteroides se inició el día 18 después de la infusión debido a malestar y síndrome febril no infeccioso. La línea de referencia (punteada) indica el límite superior normal para ALC. La Figura 5B representa los resultados de experimentos ejemplares que tienen una biopsia de corte secuencial de médula ósea o especímenes de coágulos de pacientes UPN 01 y 03 para CD20. La infiltración de pretratamiento con leucemia presente en ambos pacientes estuvo ausente en muestras post tratamiento acompañadas de normalización de la celularidad y hematopoyesis de triple linaje. UPN 01 no ha detectado ninguna célula LLC evaluada por citometría de flujo, citogenética e hibridación in situ fluorescente o linfocitos B normales detectados por citometría de flujo en médula ósea o sangre. UPN 03 tenía 5% de linfocitos B CD5-negativos normales residuales confirmados por citometría de flujo en el día +23, lo que también mostró que eran policlonales; no se detectaron linfocitos B normales al día +176. La Figura 5C representa los resultados de experimentos utilizando imágenes de TC secuencial para evaluar la resolución rápida de linfadenopatía generalizada resistente a quimioterapia. Masas axilares bilaterales resueltas por 83 (UPN 01) y 31 (UPN 03) días post infusión, según se indica mediante flechas y círculo.

La Figura 6, que comprende las Figuras 6A a 6C, es una serie de imágenes que representan los recuentos absolutos de linfocitos y las células CART19+ totales en circulación para UPN 01, 02, 03. El número total de linfocitos (células LLC y células normales totales) vs. células CART19+ totales en circulación se representa para los 3 sujetos usando el recuento absoluto de linfocitos de los valores de CBC y asumiendo un volumen de sangre de 5,0 L. El número total de células CART19 en circulación se calculó usando los valores de CBC en tándem con recuentos de linfocitos absolutos y los valores de marcado de Q-PCR como se muestra en la Figura 2, convirtiendo copias/ μ g de ADN al % de marcado medio como se describe en otra parte del presente documento. Se encontró que el % marcaje de Q-PCR se correlacionaba estrechamente (variación <2 veces) con la caracterización de citometría de flujo de los productos de infusión y con datos de muestras en los que se disponía de datos de citometría de flujo concomitantes para numerar directamente células CART19 por tinción.

La Figura 7, que comprende las Figuras 7A a 7D son una serie de imágenes que representan experimentos que implican la detección directa ex vivo de células CART19 positivas en UPN-01 PBMC, 71 días después de la infusión de células. Las PBMC de UPN-01 recogidas tras aféresis el día 71 tras infusión o congelados en el momento de la aféresis para la fabricación del producto de linfocitos T (línea de base) y se descongelaron de forma viable antes de la tinción, se sometieron a análisis de citometría de flujo para detectar la presencia de células CART19 que expresan la porción CAR 19 en la superficie. Para evaluar la expresión de CAR19 en el linfocito, las muestras fueron coteñidas con CD3-PE y el anticuerpo anti-IDR1 idiopático conjugado con Alexa-647, o coteñado con CD3-PE solo (FMO para CAR19). La Figura 7A describe que una selección inicial de linfocitos se estableció basándose en la dispersión hacia adelante y en el lado (FSC vs SSC), seguido por la selección de células CD3+. La Figura 7B representa la selección de los linfocitos CD3+; La Figura 7C representa la tinción idiopática CAR; La Figura 7D representa el idiotipo CAR FMO. La selección positiva para CAR19 se estableció en las muestras FMO CAR19.

La Figura 8, que comprende las Figuras 8A a 8C, es una serie de imágenes que representan la estrategia de selección para identificar la expresión de CART19 usando citometría de flujo policromática en muestras de sangre UPN 03. La estrategia de bloqueo para la Figura 8C se muestra para la muestra de UPN 03 día 56 y es representativa de la estrategia utilizada en la muestra de UPN 03 día 169. La Figura 8A representa la selección primaria: descarte (CD14, CD16, live/dead Aqua) negativo, CD3-positivo. La Figura 8B representa la selección secundaria: CD4-positivas, CD8 positivas. La Figura 8C representa la selección terciaria: CAR19-positivas y CAR19-negativas, establecidas en las muestras de CAR FMO (paneles de la derecha).

La Figura 9 representa la estrategia de bloqueo para identificar directamente la expresión de CART19 y los linfocitos B en especímenes de sangre y médula ósea. La estrategia de bloqueo para la Figura 4A, que muestra la detección de linfocitos CD3+ que expresan CAR y la ausencia de linfocitos B en la periferia y la médula. Izquierda: bloqueo de células; Panel superior: selección positiva para células CD3+, panel inferior: selección negativa (CD14-negativa, CD3-negativa) para linfocitos B. NC365, células de control de sangre periférica de un donante sano.

La Figura 10 es una imagen que resume la demografía y la respuesta del paciente.

La Figura 11 representa el proceso de fabricación de células CART-19

La Figura 12, que comprende las Figuras 12A a 12D, es una serie de imágenes que representan la respuesta clínica en un paciente. La Figura 12A muestra el vector lentiviral utilizado para infectar linfocitos T del paciente. Se produjo un vector lentiviral pseudotipado de grado clínico de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (pELPs 19-BB-z) dirigiendo la expresión de scF anti-CD19 derivado de anticuerpo monoclonal murino FMC63, bisagra de CD8 α humana y dominio transmembrana, y dominios de señalización humanos 4-1BB y CD3. Detalles del transgén CAR19, en la parte inferior de la figura 12A, se muestran los elementos funcionales principales. La figura no está a escala. 3'LTR significa repetición terminal larga en 3'; 5'LTR, repetición terminal larga en 5'; Amp R, gen de resistencia a la ampicilina; GH poli A bovina, hormona de crecimiento bovino con cola de poliadenilación; cPPT/CTS, tramo central de polipurina con secuencia de terminación central; EF-1 α , factor de elongación 1-alfa; env, cubierta; gag, antígeno específico del grupo; pol, gen de VIH que codifica la polimerasa y la transcriptasa inversa; R, repetición; RRE, elemento de respuesta a rev; scFv, fragmento variable de cadena sencilla; TM, transmembrana; y WPRE, elemento de regulación postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota. La Figura 12B muestra los niveles de creatinina sérica, ácido úrico y lactato deshidrogenasa (LDH) desde el día 1 hasta el día 28 después de la primera infusión de células CART19. Los niveles máximos coincidieron con la hospitalización por el síndrome de lisis tumoral. La Figura 12C muestra muestras de biopsia de médula ósea obtenidas 3 días después de la quimioterapia (día -1, antes de la infusión de células CART19) y 23 días y 6 meses después de la infusión de células CART19 (hematoxilina y eosina). El espécimen de referencia muestra la médula ósea hiperplásica (60%) con hematopoyesis de tres linajes, infiltrada por agregados predominantemente intersticiales de linfocitos pequeños y maduros que representan el 40% del total de células. El espécimen obtenido el día 23 muestra agregados linfoides residuales (10%) negativos para la leucemia linfocítica crónica (LLC), con una mezcla de linfocitos T y linfocitos B CD5 negativos. El espécimen obtenido 6 meses después de la infusión muestra hematopoyesis de tres linajes, sin agregados linfoides y ausencia continuada de LLC. La figura 12D muestra tomografías computarizadas contrastadas obtenidas antes de que el paciente estuviera reclutado en el estudio y 31 días y 104 días después de la primera infusión. La TC de preinfusión revela masas bilaterales de 1 a 3 cm. La regresión de la linfadenopatía axilar ocurrió dentro de un mes después de la infusión y se mantuvo. Las flechas destacan varios ganglios linfáticos agrandados antes de la terapia y las respuestas de los ganglios linfáticos en tomografías computarizadas comparables después de la terapia.

La Figura 13, que comprende las Figuras 13A a 13E, es una serie de imágenes que representan citoquinas de suero y de médula ósea antes y después de la infusión de linfocitos T de receptor de antígeno quimérico. Las mediciones en serie de la citoquina interferón- γ (Figura 13A), el motivo de quimioquina 10 C-X-C de quimioquina estimulada por interferón- γ (CXCL10) (Figura 13B) y el ligando 9 del motivo C-X-C (CXCL9) (Figura 13C), y la interleuquina-6 (Figura 13D) se midieron en los puntos de tiempo indicados. El aumento en estas citoquinas inflamatorias y quimioquinas coincidió con el inicio del síndrome de lisis tumoral. Se detectaron niveles bajos de interleuquina-6 en la línea basal, mientras que el interferón- γ , CXCL9 y CXCL10 estaban por debajo de los límites de detección en la línea basal. Los intervalos de curva estándar para los análisis y los valores basales en el paciente, dados entre paréntesis, fueron los siguientes: interferón- γ , 11,2 a 23,972 pg por mililitro (1,4 pg por mililitro); CXCL10, 2,1 a 5319 pg por mililitro (274 pg por mililitro); CXCL9, 48,2 a 3700 pg por mililitro (177 pg por mililitro); interleuquina-6, 2,7 a 4572 pg por mililitro (8,3 pg por mililitro); factor de necrosis tumoral α (TNF- α), 1,9 a 4005 pg por mililitro (no detectable); y el receptor de interleuquina-2 soluble, 13,4 a 34,210 pg por mililitro (644 pg por mililitro). La Figura 13E muestra la inducción de la respuesta inmune en la médula ósea. Se midieron las citoquinas TNF- α , interleuquina-6, interferón- γ , quimioquina CXCL9 y receptor soluble de interleuquina-2 en fluidos sobrenadantes obtenidos de aspirados de médula ósea en los días indicados antes y después de la infusión de células CART19. Los aumentos de los niveles de interleuquina-6, interferón- γ , CXCL9 y receptor soluble de interleuquina-2 coincidieron con el síndrome de lisis tumoral, la máxima infiltración de linfocitos T del receptor de antígeno quimérico y la erradicación del infiltrado leucémico.

La Figura 14, que comprende las Figuras 14A a 14C, es una serie de imágenes que representan la expansión y persistencia de linfocitos T del receptor de antígeno quimérico in vivo. Se aisló ADN genómico (gDNA) a partir de muestras de la sangre entera del paciente (Figura 14A) y aspirados de médula ósea (Figura 14B) recogidos en puntos de tiempo seriados antes y después de la infusión de linfocitos T de receptor de antígeno quimérico y se usaron para análisis cuantitativos en tiempo real de reacción en cadena de polimerasa (PCR). Como se evaluó en base al ADN transgénico y al porcentaje de linfocitos que expresan CAR19, los linfocitos T del

receptor antigénico quimérico se expandieron a niveles que eran 1000 veces más altos que los niveles iniciales de injerto en la sangre periférica y la médula ósea. Los niveles máximos de linfocitos T de receptor de antígeno quimérico se correlacionaron temporalmente con el síndrome de lisis tumoral. Una muestra de sangre obtenida el día 0 y una muestra de médula ósea obtenida el día 1 no tenía señal de PCR en la línea basal. El análisis de citometría de flujo de aspirados de médula ósea en la línea basal (Figura 14C) muestra una infiltración predominante con células clonales CD19+ CD5+, evaluadas mediante tinción de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina, con una escasez de linfocitos T. El día 31 después de la infusión, había presentes linfocitos T CD5+, y no se detectaron linfocitos B normales o malignos. Los números indican la frecuencia relativa de las células en cada cuadrante. Tanto el eje x como el eje y muestran una escala log10. La estrategia de bloqueo implicó un bloqueo inicial en las células CD19+ y CD5+ en los cuadros de la izquierda y la posterior identificación de la expresión de kappa y lambda de inmunoglobulina en el subconjunto CD19+ CD5+ (cuadros de la derecha)

Descripción detallada

La invención se refiere a composiciones para tratar el cáncer incluyendo, pero sin limitarse a, neoplasias hematológicas malignas y tumores sólidos. La presente invención se refiere a una estrategia de transferencia de células adoptivas de linfocitos T transducidos para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR). Los CAR son moléculas que combinan especificidad basada en anticuerpos para un antígeno deseado (por ejemplo, antígeno tumoral) con un dominio intracelular activador del receptor de linfocitos T para generar una proteína quimérica que exhibe una actividad inmune celular antitumoral específica.

La presente invención se refiere en general al uso de linfocitos T genéticamente modificados para expresar de manera estable un CAR deseado como se define en las reivindicaciones. Los linfocitos T que expresan un CAR se denominan en el presente documento como linfocitos T CAR o linfocitos T CAR modificados. Preferiblemente, la célula puede modificarse genéticamente para expresar de manera estable un dominio de unión a anticuerpo en su superficie, confiriendo una nueva especificidad de antígeno que es independiente del MHC. El linfocito T se modifica genéticamente para expresar de manera estable un CAR que combina un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico con un dominio intracelular de la proteína de cadena de CD3-zeta en una única proteína quimérica.

Tal como se describe en el presente documento, el CAR descrito en el presente documento comprende un dominio extracelular que tiene un dominio de reconocimiento de antígeno, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico. Como se describe en el presente documento, se utiliza el dominio transmembranal que está naturalmente asociado con uno de los dominios en el CAR. También como se describe aquí, el dominio transmembranal puede seleccionarse o modificarse mediante la sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana de superficie para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor. Preferiblemente, el dominio transmembrana es el dominio de bisagra CD8 α .

Con respecto al dominio citoplásmico, el CAR descrito en el presente documento comprende el dominio de señalización 4-1BB. El dominio citoplásmico del CAR puede ser diseñado para comprender adicionalmente el dominio de señalización de CD3-zeta. El dominio citoplásmico del CAR incluye módulos de señalización CD3-zeta y 4-1BB. Por consiguiente, la invención proporciona linfocitos T CAR y su uso para terapia adoptiva.

Tal como se describe en el presente documento, los linfocitos T CAR descritos en el presente documento pueden generarse introduciendo un vector lentiviral que comprende un CAR deseado, por ejemplo, un CAR que comprende anticuerpo anti CD19, CD8 α y dominio transmembrana y dominios humanos de señalización 4-1BB y CD3-zeta, en las células. Los linfocitos T CAR de la invención son capaces de replicarse in vivo dando como resultado una persistencia a largo plazo que puede conducir a un control sostenido del tumor.

También se describe aquí la administración de un linfocito T genéticamente modificado que expresa un CAR para el tratamiento de un paciente que tiene cáncer o que está en riesgo de tener cáncer usando infusión de linfocitos. Preferiblemente, se utiliza infusión linfocítica autóloga en el tratamiento. Las PBMC autólogas se recogen de un paciente que necesita tratamiento y los linfocitos T se activan y expanden usando los métodos descritos en el presente documento y conocidos en la técnica y luego se infunden de nuevo al paciente.

También se describe aquí el tratamiento de un paciente en riesgo de desarrollar LLC. También se describe en la presente invención el tratamiento de una neoplasia maligna o una enfermedad autoinmune en la que la quimioterapia y/o la inmunoterapia en un paciente da como resultado una inmunosupresión significativa en el paciente, aumentando así el riesgo de que el paciente desarrolle LLC.

Como se describe en el presente documento, se usan métodos que usan linfocitos T que expresan un CAR anti-CD19 que incluye CD3-zeta y el dominio coestimulador 4-1 BB (también denominados linfocitos T CART19). Los linfocitos T CART19 descritos en este documento pueden someterse a una fuerte expansión de linfocitos T in vivo y pueden establecer células de memoria específicas de CD19 que persisten a niveles elevados durante un

periodo prolongado de tiempo en sangre y médula ósea. En algunos casos, los linfocitos T CART19 infundidos en un paciente pueden eliminar las células de leucemia in vivo en pacientes con LLC resistente a la quimioterapia avanzada.

5 Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica al que pertenece la invención. Aunque en la práctica se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento para ensayar la presente invención, se describen los materiales y métodos preferidos. En la descripción y reivindicación de la presente invención, se usará la siguiente terminología.

También se debe entender que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir únicamente realizaciones particulares y no pretende limitarlas.

Los artículos "un/uno" y "una" se usan aquí para referirse a uno o a más de uno (es decir, por lo menos a uno) del objeto gramatical del artículo. Por ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Se entiende que "alrededor de" tal como se utiliza en el presente documento cuando se hace referencia a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, abarca variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferiblemente $\pm 5\%$, incluso más preferiblemente $\pm 1\%$, y aún más preferiblemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos descritos.

"Activación", como se usa en el presente documento, se refiere al estado de un linfocito T que ha sido suficientemente estimulado para inducir una proliferación celular detectable. La activación también puede estar asociada con la producción inducida de citoquinas y funciones efectoras detectables. El término "linfocitos T activados" se refiere, entre otras cosas, a linfocitos T que están experimentando división celular.

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

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos scFv y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Una "cadena pesada de anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere al más grande de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en todas las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones naturales.

Una "cadena ligera de anticuerpo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al menor de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en todas las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones naturales, las cadenas ligeras κ y λ se refieren a los dos isotipos de cadena ligera de anticuerpo .

Por el término "anticuerpo sintético" tal como se utiliza en el presente documento, se entiende un anticuerpo que se genera usando tecnología de ADN recombinante, tal como, por ejemplo, un anticuerpo expresado por un bacteriófago como se describe en el presente documento. El término debe entenderse también como un anticuerpo que ha sido generado mediante la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo y cuya molécula de ADN expresa una proteína de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, en la que la secuencia de ADN o aminoácidos se ha obtenido utilizando tecnología de secuencia de aminoácidos o de ADN sintético que está disponible y es bien conocida en la técnica.

El término "antígeno" o "Ag" tal como se utiliza en el presente documento se define como una molécula que provoca una respuesta inmune. Esta respuesta inmune puede implicar ya sea la producción de anticuerpos, o la activación de células inmunológicamente competentes específicas, o ambas. El experto en la técnica comprenderá que cualquier macromolécula, incluyendo virtualmente todas las proteínas o péptidos, puede servir como antígeno. Además, los antígenos pueden derivarse de ADN recombinante o genómico. Un experto en la materia comprenderá que cualquier ADN que comprenda secuencias de nucleótidos o una secuencia de

nucleótidos parcial que codifique una proteína que provoque una respuesta inmune, por lo tanto, codifica un "antígeno" tal como se utiliza en el presente documento. Además, un experto en la técnica comprenderá que un antígeno no necesita estar codificado únicamente por una secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen. Es evidente que la presente invención incluye, pero no se limita a, el uso de secuencias de nucleótidos parciales de más de un gen y que estas secuencias de nucleótidos están dispuestas en diversas combinaciones para provocar la respuesta inmune deseada. Además, un experto en la técnica comprenderá que un antígeno no necesita ser codificado por un "gen" en absoluto. Es fácilmente evidente que se puede generar un antígeno sintetizado o puede derivarse de una muestra biológica. Dicha muestra biológica puede incluir, pero no está limitada a, una muestra de tejido, una muestra de tumor, una célula o un fluido biológico.

El término "efecto antitumoral" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un efecto biológico que puede manifestarse por una disminución en el volumen tumoral, una disminución en el número de linfocitos tumorales, una disminución en el número de metástasis, un aumento en la esperanza de vida, o una mejora de diversos síntomas fisiológicos asociados con la condición cancerosa. Un "efecto antitumoral" también puede manifestarse por la capacidad de los péptidos, polinucleótidos, células y anticuerpos de la invención en la prevención de la aparición de tumor en primer lugar.

El término "auto-antígeno" significa, de acuerdo con la presente invención, cualquier auto-antígeno que el sistema inmune reconozca erróneamente como exógeno. Los auto-antígenos comprenden, pero no se limitan a, proteínas celulares, fosfoproteínas, proteínas de superficie celular, lípidos celulares, ácidos nucleicos, glicoproteínas, incluyendo receptores de superficie celular.

El término "enfermedad autoinmune" tal como se usa en el presente documento se define como un trastorno que resulta de una respuesta autoinmune. Una enfermedad autoinmune es el resultado de una respuesta inadecuada y excesiva a un auto-antígeno. Ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, hepatitis autoinmune, parotiditis autoinmune, enfermedad de Crohn, diabetes (Tipo I), epidermolisis ampollosa distrófica, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pemphigus vulgaris, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, espondiloartropatías, tiroiditis, vasculitis, vitiligo, mixedema, anemia perniciosa, colitis ulcerosa, entre otras.

Tal como se usa en el presente documento, el término "autólogo" pretende referirse a cualquier material derivado del mismo individuo al que más tarde será reintroducido en el individuo.

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

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

El término "cáncer" tal como se utiliza en el presente documento se define como una enfermedad caracterizada por el crecimiento rápido e incontrolado de células aberrantes. Las células cancerosas pueden propagarse localmente o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. Los ejemplos de varios cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de cerebro, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y similares.

El término "ligando coestimulador", tal como se utiliza en el presente documento, incluye una molécula en una célula presentadora de antígeno (por ejemplo, aAPC, célula dendrítica, linfocito B y similares) que se une específicamente a una molécula coestimuladora afín en un linfocito T, proporcionando así una señal que, además de la señal primaria proporcionada, por ejemplo, por la unión de un complejo TCR/CD3 con una molécula de MHC cargada con péptido, media una respuesta de linfocitos T, incluyendo, pero sin limitarse a, proliferación, activación, diferenciación y similares. Un ligando coestimulador puede incluir, pero sin limitación, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BB, OX40L, ligando coestimulador inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor de linfotóxina beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, un agonista o anticuerpo que se une al receptor del ligando Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3. Un ligando coestimulador también abarca, entre otros, un anticuerpo que se une específicamente con una molécula coestimuladora presente en un linfocito T, tal como, pero sin limitarse a, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno-1 asociado a función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83.

Una "molécula coestimuladora" se refiere a la pareja de unión cognada en un linfocito T que se une específicamente con un ligando coestimulador, mediando de ese modo una respuesta coestimuladora por la célula T, tal como, pero sin limitarse a, proliferación. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero no se limitan a, molécula MHC de clase I, BTLA y un receptor de ligando Toll.

Una "señal coestimuladora", como se usa en el presente documento, se refiere a una señal que, en combinación con una señal primaria, tal como la ligación TCR/CD3, conduce a la proliferación de linfocitos T y/o regulación positiva o regulación negativa de moléculas clave,

5 Una "enfermedad" es un estado de salud de un animal en el que el animal no puede mantener la homeostasis, y en donde si la enfermedad no se mejora, la salud del animal continúa deteriorándose. Por el contrario, un "trastorno" en un animal es un estado de salud en el que el animal es capaz de mantener la homeostasis, pero en el que el estado de salud del animal es menos favorable de lo que sería en ausencia del trastorno. Si no se trata, un trastorno no necesariamente ocasiona una disminución adicional en el estado de salud del animal.

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

15 "Codificación" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARN, para servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia de nucleótidos definida (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia de aminoácidos definida y las propiedades biológicas resultantes de la misma. De este modo, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm correspondiente a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena de codificación, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y se proporciona usualmente en listas de secuencias, y la cadena no codificante, utilizada como plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, se puede referir a que codifica la proteína u otro producto de ese gen o cDNA.

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

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

30 El término "expresión" tal como se utiliza en el presente documento se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos determinada impulsada por su promotor.

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

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

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

65 Tal como se usa en el presente documento, un "material de instrucción" incluye una publicación, una grabación, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que pueda usarse para comunicar la utilidad de las composiciones y métodos de la invención. El material de instrucción del equipo de la invención puede estar

fijado, por ejemplo, a un recipiente que contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición de la invención o enviarse junto con un recipiente que contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición. Alternativamente, el material de instrucción puede enviarse separadamente del recipiente con la intención de que el material de instrucción y el compuesto sean utilizados cooperativamente por el receptor.

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

En el contexto de la presente invención, se utilizan las siguientes abreviaturas para las bases de ácidos nucleicos que se producen comúnmente. "A" se refiere a adenosina, "C" se refiere a citosina, "G" se refiere a guanosina, "T" se refiere a timidina, y "U" se refiere a uridina.

A menos que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La frase secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o un ARN también puede incluir intrones en la medida en que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede en alguna versión contener un intrón.

Un "lentivirus" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un género de la familia de Retroviridae. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus en ser capaces de infectar células que no se dividen; pueden suministrar una cantidad significativa de información genética al ADN de la célula huésped, por lo que son uno de los métodos más eficaces de un vector de administración génica. VIH, VIS y VIF son ejemplos de lentivirus. Los vectores derivados de lentivirus ofrecen los medios para lograr niveles significativos de transferencia génica in vivo.

Mediante el término "modulando", tal como se usa en el presente documento, se quiere significar la mediación de un aumento o disminución detectable en el nivel de una respuesta en un sujeto en comparación con el nivel de una respuesta en el sujeto en ausencia de un tratamiento o compuesto, y/o comparado con el nivel de una respuesta en un sujeto por lo demás idéntico, pero no tratado. El término abarca perturbar y/o afectar una señal o respuesta nativa mediando de este modo una respuesta terapéutica beneficiosa en un sujeto, preferiblemente un ser humano.

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

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

El término antígeno tumoral "sobrexpresado" o "sobrexpresión" del antígeno tumoral pretende indicar un nivel anormal de expresión del antígeno tumoral en una célula desde un área de enfermedad como un tumor sólido dentro de un tejido u órgano específico del paciente en relación con el nivel de expresión en una célula normal a partir de ese tejido u órgano. Los pacientes que tienen tumores sólidos o una neoplasia hematológica maligna caracterizada por sobreexpresión del antígeno tumoral pueden determinarse mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica.

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

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

El término "polinucleótido" tal como se utiliza en el presente documento se define como una cadena de nucleótidos. Además, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. Por lo tanto, los ácidos nucleicos y los

polinucleótidos tal como se usan en el presente documento son intercambiables. Un experto en la técnica tiene el conocimiento general de que los ácidos nucleicos son polinucleótidos, que pueden hidrolizarse en los "nucleótidos" monoméricos. Los nucleótidos monoméricos pueden hidrolizarse en nucleósidos. Como se usan aquí, los polinucleótidos incluyen, pero no se limitan a, todas las secuencias de ácido nucleico que se obtienen por cualquier medio disponible en la técnica, incluyendo, sin limitación, medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácido nucleico de una biblioteca recombinante o genoma celular, usando tecnología de clonación ordinaria y PCR TM, y similares, y por medios sintéticos.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente, y se refieren a un compuesto formado por residuos de aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos y no se limita el número máximo de aminoácidos que pueden comprender la secuencia de una proteína o péptido. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Tal como se utiliza en el presente documento, el término se refiere a ambas cadenas cortas, que también se denominan comúnmente en la técnica péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, y a cadenas más largas, que en general se denominan en la técnica proteínas, de las que hay muchos tipos. Los "polipéptidos" incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Los polipéptidos incluyen péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos, o una combinación de los mismos.

El término promotor, tal como se utiliza aquí, se define como una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, requerida para iniciar la transcripción específica de una secuencia polinucleotídica.

Tal como se utiliza aquí, el término "secuencia promotora/reguladora" significa una secuencia de ácido nucleico que se requiere para la expresión de un producto génico unido operativamente a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora del núcleo y en otros casos, esta secuencia también puede incluir una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que se requieren para la expresión del producto génico. La secuencia promotora/reguladora puede, por ejemplo, ser una que exprese el producto génico en una forma específica de tejido.

Un promotor "constitutivo" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está operativamente unido a un polinucleótido codificado o especificado por un gen, hace que el producto génico se produzca en una célula bajo la mayor parte o en todas las condiciones fisiológicas de la célula.

Un promotor "inducible" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está operativamente unido a un polinucleótido codificado o especificado por un gen, hace que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente sólo cuando está presente un inductor en la célula que corresponde al promotor.

Un promotor "específico de tejido" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está operativamente unido a un polinucleótido codificado o especificado por un gen, hace que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente sólo si la célula es una célula del tejido tipo correspondiente al promotor.

Por el término "se une específicamente", tal como se usa aquí con respecto a un anticuerpo, se entiende un anticuerpo que reconoce un antígeno específico, pero no reconoce o se une a otras moléculas en una muestra.

Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de una especie también puede unirse a ese antígeno de una o más especies. Sin embargo, tal reactividad entre especies no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específica. En otro ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno también puede unirse a diferentes formas alélicas del antígeno. Sin embargo, tal reactividad cruzada no altera la clasificación de un anticuerpo como específica. En algunos casos, los términos "unión específica" o "se une específicamente" pueden usarse en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, para significar que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o epítipo) sobre las especies químicas; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de a proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epítipo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o A libre, sin marcar), en una reacción que contiene la etiqueta "A" y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcada unida al anticuerpo.

Por el término "estimulación" se entiende una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimuladora (por ejemplo, un complejo TCR/CD3) con su ligando afín, mediando así un evento de transducción de señales, tal como, pero sin limitarse a, transducción de señales a través del complejo TCR/CD3. La estimulación puede mediar la expresión alterada de ciertas moléculas, tales como la regulación negativa de TGF- β , y/o la reorganización de estructuras citoesqueléticas, y similares.

Una "molécula estimuladora", como se usa aquí el término, significa una molécula en un linfocito T que se une específicamente con un ligando estimulador afín presente en una célula presentadora de antígeno.

Un "ligando estimulador", tal como se utiliza en el presente documento, significa un ligando que cuando está presente en una célula presentadora de antígeno (por ejemplo, una aAPC, una célula dendrítica, una célula B y similares) puede unirse específicamente con una pareja de unión afín (referido aquí como una "molécula estimuladora") en un linfocito T, mediando de este modo una respuesta primaria por la célula T, incluyendo, pero sin limitarse a, la activación, el inicio de una respuesta inmune, la proliferación y similares. Los ligandos estimuladores son bien conocidos en la técnica y abarcan, entre otros, una molécula MHC de clase I cargada con un péptido, un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD28 superagonista y un anticuerpo anti-CD2 superagonista.

El término "sujeto" pretende incluir organismos vivos en los que se puede inducir una respuesta inmune (por ejemplo, mamíferos). Ejemplos de sujetos incluyen humanos, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de los mismos.

Tal como se utiliza en el presente documento, una célula "sustancialmente purificada" es una célula que está esencialmente libre de otros tipos de células. Una célula sustancialmente purificada también se refiere a una célula que ha sido separada de otros tipos celulares con los que está normalmente asociada en su estado natural. En algunos casos, una población de células sustancialmente purificadas se refiere a una población homogénea de células. En otros casos, este término se refiere simplemente a células que han sido separadas de las células con las que están naturalmente asociadas en su estado natural. En algunas realizaciones, las células se cultivan in vitro. En otras realizaciones, las células no se cultivan in vitro.

El término "terapéutico" tal como se utiliza en el presente documento significa un tratamiento y/o profilaxis. Se obtiene un efecto terapéutico mediante supresión, remisión o erradicación de un estado patológico.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del compuesto objeto que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema o sujeto que está siendo buscada por el investigador, veterinario, médico u otro clínico. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" incluye la cantidad de un compuesto que, cuando se administra, es suficiente para prevenir el desarrollo de, o aliviar hasta cierto punto, uno o más signos o síntomas del trastorno o enfermedad que se está tratando. La cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del compuesto, la enfermedad y su gravedad y la edad, peso, etc., del sujeto a tratar.

Para "tratar" una enfermedad tal como se utiliza en el presente documento, significa reducir la frecuencia o gravedad de al menos un signo o síntoma de una enfermedad o trastorno experimentado por un sujeto.

El término "transfectado" o "transformado" o "transducido" como se usa en el presente documento se refiere a un proceso mediante el cual el ácido nucleico exógeno se transfiere o se introduce en la célula huésped. Una célula "transfectada" o "transformada" o "transducida" es una célula que ha sido transfectada, transformada o transducida con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula del sujeto primario y su progenie.

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

Un "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que puede usarse para suministrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. Numerosos vectores son conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfifílicos, plásmidos y virus. Por lo tanto, el término "vector" incluye un plásmido de replicación autónoma o un virus. El término también debe interpretarse que incluye compuestos no plasmídicos y no virales que facilitan la transferencia de ácidos nucleicos en células, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas y similares. Ejemplos de vectores víricos incluyen, pero no se limitan a, vectores adenovirales, vectores de virus adenoasociados, vectores retrovirales, y similares.

Rangos: a lo largo de esta descripción, se pueden presentar varios aspectos de la invención en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible en el alcance de la invención. Por consiguiente, se debe considerar que la descripción de un intervalo describe específicamente todos los subrangos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 tiene subconjuntos específicamente descritos de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como los números individuales dentro de ese rango, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto se aplica independientemente a la amplitud del intervalo.

Descripción

La presente invención proporciona composiciones para tratar el cáncer. El cáncer puede ser una neoplasia hematológica maligna, un tumor sólido, un tumor primario o un tumor metastásico. Preferiblemente, el cáncer es una neoplasia hematológica maligna, y más preferiblemente, el cáncer es la leucemia linfocítica crónica (LLC).

En una realización, la invención proporciona un linfocito T modificado por ingeniería genética para expresar un CAR en el que el linfocito T CAR exhibe una propiedad antitumoral como se define aquí. El CAR puede ser diseñado para comprender un dominio extracelular que tiene un dominio de unión a antígeno CD 19 fusionado al dominio de señalización intracelular CD3 zeta de la cadena zeta del complejo de receptor de antígeno de linfocitos T. El CAR cuando se expresa en un linfocito T es capaz de redirigir el reconocimiento del antígeno basado en la especificidad de unión al antígeno. El CD19 se expresa en linfocitos B malignos. La porción de unión al antígeno se fusiona con un dominio intracelular a partir de una molécula coestimuladora y una cadena zeta que son un dominio de señalización CD137 (4-1BB) y un dominio de señalización CD3-zeta.

Tal como se describe en el presente documento, el CAR comprende un dominio de señalización CD137 (4-1BB). Esto se debe a que la presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que las respuestas de linfocitos T mediadas por CAR pueden mejorarse adicionalmente con la adición de dominios coestimuladores. Por ejemplo, la inclusión del dominio de señalización de CD137 (4-1BB) aumentó significativamente la actividad antitumoral y la persistencia in vivo de linfocitos T CAR en comparación con un linfocito T CAR idéntico de no modificado genéticamente para expresar CD137 (4-1BB).

Composición

La presente invención proporciona la utilización de linfocitos T genéticamente modificados para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio extracelular e intracelular tal como se define aquí. El dominio extracelular comprende un elemento de unión específico de diana, de otro modo referido como una porción de unión a antígeno. El dominio intracelular o de otro modo el dominio citoplasmático comprende, una región de señalización coestimuladora y una porción de cadena zeta. La región de señalización coestimuladora se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de superficie celular distintas de los receptores de antígenos o sus ligandos que se requieren para una respuesta eficiente de los linfocitos al antígeno.

Entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana del CAR, o entre el dominio citoplasmático y el dominio transmembrana del CAR, puede incorporarse un dominio espaciador. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "dominio espaciador" significa generalmente cualquier oligopéptido o polipéptido que funciona para enlazar el dominio transmembranal con el dominio extracelular o con el dominio citoplasmático en la cadena polipeptídica. Un dominio espaciador puede comprender hasta 300 aminoácidos, preferiblemente de 10 a 100 aminoácidos y más preferiblemente de 25 a 50 aminoácidos.

Fracción de unión al antígeno

El CAR descrito en el presente documento comprende un elemento de unión específico de diana, de otro modo referido como una porción de unión al antígeno.

En el contexto de la presente descripción, "antígeno tumoral" o "antígeno de trastorno hiperproliferativo" o "antígeno asociado con un trastorno hiperproliferativo", se refiere a antígenos que son comunes a trastornos hiperproliferativos específicos tales como cáncer. Los antígenos aquí discutidos se incluyen meramente a modo de ejemplo. La lista no pretende ser exclusiva y otros ejemplos serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

Los antígenos tumorales son proteínas que son producidas por células tumorales que provocan una respuesta inmune, particularmente respuestas inmunes mediadas por linfocitos T. Los antígenos tumorales son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, un antígeno asociado a glioma, antígeno carcinoembrionario (CEA), gonadotropina coriónica β humana, alfafetoproteína (AFP), AFP reactiva a lectina, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CA IX, transcriptasa inversa de telomerasa humana, RU1, RU2 (AS), carboxil esterasa intestinal, mut hsp70-2, M-CSF, prostasa, antígeno prostático específico (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, prosteína, PSMA, Her2/neu, survivina y telomerasa, antígeno-1 de tumor de carcinoma de próstata (PCTA-1), MAGE, ELF2M, elastasa de neutrófilos, ephrinB2, CD22, IGF-II, IGF-II, receptor de IGF-I y mesotelina.

Los tumores malignos expresan una serie de proteínas que pueden servir como antígenos diana para un ataque inmune. Estas moléculas incluyen, pero no se limitan a antígenos específicos de tejido tales como MART-1, tirosinasa y GP 100 en melanoma y fosfatasa de ácido prostático (PAP) y antígeno prostático específico (PSA) en cáncer de próstata. Otras moléculas diana pertenecen al grupo de moléculas relacionadas con la transformación, tales como el oncogén HER-2/Neu/ErbB-2. Otro grupo de antígenos diana son antígenos onco-fetales tales como antígeno carcinoembrionario (CEA). En el linfoma de linfocitos B, la inmunoglobulina idiotipo

tumoral específica constituye un antígeno de inmunoglobulina verdaderamente tumoral específico del tumor individual. Los antígenos de diferenciación de linfocitos B tales como CD19, CD20 y CD37 son otros candidatos para antígenos diana en el linfoma de linfocitos B. Algunos de estos antígenos (CEA, HER-2, CD19, CD20, idiótipo) se han utilizado como objetivos para inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales con éxito limitado.

El tipo de antígeno tumoral referido en la descripción puede ser también un antígeno específico de tumor (TSA) o un antígeno asociado a tumor (TAA). Un TSA es único a las células del tumor y no ocurre en otras células en el cuerpo. Un antígeno asociado a TAA no es exclusivo de una célula tumoral y en su lugar también se expresa en una célula normal en condiciones que no logran inducir un estado de tolerancia inmunológica al antígeno. La expresión del antígeno sobre el tumor puede ocurrir en condiciones que permitan al sistema inmune responder al antígeno. Los TAA pueden ser antígenos que se expresan en células normales durante el desarrollo fetal cuando el sistema inmune es inmaduro y no puede responder o pueden ser antígenos que están normalmente presentes a niveles extremadamente bajos en células normales pero que se expresan a niveles mucho más altos en células tumorales.

Ejemplos no limitantes de antígenos TSA o TAA incluyen los siguientes: antígenos de diferenciación tales como MART-1/MelanA (MART-I), gp100 (Pmel 17), tirosinasa, TRP-1, TRP-2 y antígenos específicos de tumores multilínea tales como MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; antígenos embrionarios sobreexpresados tales como CEA; oncogenes sobreexpresados y genes supresores de tumores mutados tales como p53, Ras, HER-2/neu; antígenos tumorales únicos resultantes de translocaciones cromosómicas; tales como BCR-ABL, E2A-PRL, H4RET, IGH-IGK, MYLRAR; y antígenos virales, tales como los antígenos EBVA del virus de Epstein Barr y los antígenos E6 y E7 del virus del papiloma humano (HPV). Otros antígenos grandes de base proteica incluyen TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19 -9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, beta-Catenina, CDK4, Mum-1, p15, p16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, alfa-fetoproteína, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 153\CA 27,29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68P1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733EpCAM, HTgpM344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NYCO-1, RCAS1, SDCCAG16, proteína TA-90Mac-2\proteína asociada a ciclofilina C, TAAL6, TAG72, TLP y TPS.

Tal como se describe en el presente documento, otros antígenos incluyen CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, glicolípido F77, EGFRvIII, GD-2, MY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR y similares.

Tal como se describe en el presente documento, la parte de la porción de unión al antígeno del CAR de la invención está dirigida a CD19. Preferiblemente, la parte de la porción de unión al antígeno en el CAR de la invención es scFv anti-CD19, en donde la secuencia de ácido nucleico del scFv anti-CD19 comprende la secuencia expuesta en el Id. de Sec. N°: 14. Alternativamente, el scFv anti-CD19 comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 20. En otra realización, la porción scFv anti-CD19 del CAR de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de Sec. N°: 20.

Dominio transmembrana

Con respecto al dominio transmembrana, el CAR puede ser diseñado para comprender un dominio transmembrana que está fusionado al dominio extracelular del CAR. En una realización, se utiliza el dominio transmembranal que está naturalmente asociado con uno de los dominios en el CAR. En algunos casos, el dominio transmembranal puede ser seleccionado o modificado por sustitución de aminoácidos para evitar la unión de tales dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana de superficie para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

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

Preferiblemente, el dominio transmembrana en el CAR de la invención es el dominio transmembrana CD8. En una realización, el dominio transmembrana CD8 comprende la secuencia de ácidos nucleicos de Id. de Sec. N°: 16. En una realización, el dominio transmembrana CD8 comprende la secuencia de ácidos nucleicos de Id. de

Sec. N°: 22. En otra realización, el dominio transmembrana CD8 comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 22.

En algunos casos, el dominio transmembrana del CAR de la invención comprende el dominio bisagra CD8 α . En una realización, el dominio bisagra de CD8 comprende la secuencia de ácidos nucleicos de Id. de Sec. N°: 15. En una realización, el dominio bisagra de CD8 comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 21. En otra realización, el dominio bisagra de CD8 comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 21. En otra realización, el dominio bisagra de CD8 comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 21.

Dominio citoplasmático

El dominio citoplásmico o de otro modo el dominio de señalización intracelular del CAR de la invención es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la que se ha colocado el CAR. El término "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de un linfocito T, puede ser, por ejemplo, la actividad citolítica o actividad auxiliar incluyendo la secreción de citoquinas. Por lo tanto, el término "dominio de señalización intracelular" se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y dirige la célula para realizar una función especializada. Aunque normalmente se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario utilizar toda la cadena. En la medida en que se utiliza una parte truncada del dominio de señalización intracelular, tal porción truncada puede usarse en lugar de la cadena intacta, siempre que transduzca la señal de la función efectora. Por tanto, el término dominio de señalización intracelular incluye cualquier parte truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función efectora.

Los dominios de señalización intracelular para uso en el CAR de la invención incluyen las secuencias citoplásmicas del receptor de linfocitos T (TCR) y coreceptores que actúan en concierto para iniciar la transducción de señales después del enganche del receptor de antígeno, así como cualquier derivado o receptor variante de estas secuencias y cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional que la definida aquí.

Se sabe que las señales generadas a través del TCR son insuficientes ellas solas para la activación completa del linfocito T y que también se requiere una señal secundaria o coestimuladora. Por lo tanto, se puede decir que la activación de linfocitos T está mediada por dos clases distintas de secuencia de señalización citoplasmática: aquellas que inician la activación primaria dependiente de antígeno a través del TCR (secuencias de señalización citoplasmática primarias) y las que actúan de manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmática secundarias).

Las secuencias de señalización citoplasmática primarias regulan la activación primaria del complejo TCR bien de una manera estimuladora, o de una manera inhibitoria. Las secuencias de señalización citoplasmática primaria que actúan de una manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación a base de inmunorreceptores de tirosina o ITAM.

Ejemplos de secuencias de señalización citoplasmática primarias que contienen ITAM que son de uso particular incluyen las derivadas de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. De acuerdo con la invención, la molécula de señalización citoplasmática en el CAR de la invención comprende una secuencia de señalización citoplásmica derivada de CD3 zeta.

El dominio citoplásmico del CAR comprende el dominio de señalización CD3-zeta combinado con una región de señalización coestimuladora que se refiere a una parte del CAR que comprende el dominio intracelular de la molécula coestimuladora 4-1BB. Una molécula coestimuladora es una molécula de superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que se requiere para una respuesta eficiente de linfocitos a un antígeno. Ejemplos de otras moléculas tales como CD27, CD28, (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno-1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y un ligando que se une específicamente con CD83, y similares.

Las secuencias de señalización citoplásmicas dentro de la parte de señalización citoplásmica del CAR de la invención pueden estar unidas entre sí en un orden aleatorio o especificado. Opcionalmente, un ligando oligopéptido o polipéptido corto, preferiblemente entre 2 y 10 aminoácidos de longitud puede formar el enlace. Un doblete de glicina-serina proporciona un enlace particularmente adecuado.

El dominio citoplasmático está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB.

En una realización, el dominio citoplásmico en el CAR de la invención está diseñado para comprender el dominio de señalización de 4-1BB y el dominio de señalización de CD3-zeta, en el que el dominio de señalización de 4-1BB comprende la secuencia de ácido nucleico establecida en Id. de Sec. N°: 17 y el dominio de señalización de CD3-zeta comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en Id. de Sec. N°: 18.

En una realización, el dominio citoplásmico en el CAR de la invención está diseñado para comprender el dominio de señalización de 4-1BB y el dominio de señalización de CD3-zeta, en el que el dominio de señalización de 4-1BB comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 23 y el dominio de señalización de CD3-zeta comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 24.

En una realización, el dominio citoplásmico en el CAR de la invención está diseñado para comprender el dominio de señalización de 4-1BB y el dominio de señalización de CD3-zeta, en el que el dominio de señalización de 4-1BB comprende el conjunto de secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 23 y el dominio de señalización de CD3-zeta comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de Sec. N°: 24.

Vectores

La presente descripción abarca una construcción de ADN que comprende secuencias de un CAR, en donde la secuencia comprende la secuencia de ácido nucleico de una porción de unión a antígeno unida operativamente a la secuencia de ácido nucleico de un dominio intracelular, es decir, los dominios intracelulares de CD3-zeta y 4-1BB.

En una realización, el CAR de la invención comprende el scFv anti-CD19, la bisagra CD8 humana y el dominio transmembrana, y los dominios humanos de señalización 4-1BB y CD3 zeta. En una realización, el CAR de la invención comprende la secuencia de ácido nucleico presentada en Id. de Sec. N°: 8. En otra realización, el CAR de la invención comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 12. En otra realización, el CAR de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de Sec. N°: 12.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas deseadas pueden obtenerse utilizando métodos recombinantes conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, explorando bibliotecas de células que expresan el gen, derivando el gen de un vector que se sabe que incluye el mismo, o aislando directamente de células y tejidos que contienen el mismo, usando técnicas estándar. Alternativamente, el gen de interés se puede producir sintéticamente, en lugar de clonarlo.

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

En resumen, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican un CAR se consigue típicamente uniendo operativamente un ácido nucleico que codifica el polipéptido CAR o porciones de los mismos a un promotor, e incorporando el constructo a un vector de expresión. Los vectores pueden ser adecuados para replicación e integración en eucariotas. Los vectores de clonación típicos contienen terminadores de transcripción y traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión de la secuencia de ácido nucleico deseada.

Las construcciones de expresión descritas en el presente documento también pueden usarse para inmunización de ácidos nucleicos y terapia génica, utilizando protocolos de administración de genes estándar. Los métodos para la administración génica son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Pat. N° 5.399.346, 5.580.859, 5.589.466. En otra realización, la invención proporciona un vector de terapia génica.

El ácido nucleico puede clonarse en varios tipos de vectores. Por ejemplo, el ácido nucleico puede clonarse en un vector que incluye, pero no se limita a, un plásmido, un fagémido, un derivado de fago, un virus animal y un cósmido. Los vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sonda y vectores de secuenciación.

Además, el vector de expresión puede proporcionarse a una célula en forma de un vector viral. La tecnología de vectores virales es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Laboratorio Cold Spring Harbor, Nueva York) y en otros manuales de virología y biología molecular. Los virus, que son útiles como vectores incluyen, pero no se limitan a, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus de herpes y lentivirus. En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, una secuencia promotora, sitios de endonucleasa de restricción

convenientes y uno o más marcadores seleccionables (por ejemplo, WO 01/96584, WO 01/29058 y US Pat N° 6.326.193).

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

Elementos promotores adicionales, por ejemplo, potenciadores, regulan la frecuencia de iniciación transcripcional. Típicamente, éstos están situados en la región 30-110 pb corriente arriba del sitio de inicio, aunque recientemente se ha mostrado que varios promotores contienen elementos funcionales aguas abajo del sitio de inicio. El espaciamiento entre los elementos promotores con frecuencia es flexible, de modo que la función promotora se conserva cuando los elementos se invierten o se mueven uno con relación al otro. En el promotor de la timidina quinasa (tk), la separación entre los elementos promotores puede aumentarse hasta 50 pb antes de que la actividad empiece a disminuir. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar de forma cooperativa o independiente para activar la transcripción.

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

Con el fin de evaluar la expresión de un polipéptido CAR o porciones de los mismos, el vector de expresión que se introducirá en un linfocito también puede contener un gen marcador seleccionable o un gen indicador o ambos para facilitar la identificación y selección de células expresadoras a partir de la población de linfocitos tratada para ser transfectadas o infectadas a través de vectores virales. En otros aspectos, el marcador seleccionable puede llevarse sobre una pieza separada de ADN y utilizarse en un procedimiento de co-transfección. Tanto los marcadores seleccionables como los genes informadores pueden estar flanqueados con secuencias reguladoras apropiadas para permitir la expresión en las células huésped. Los marcadores seleccionables útiles incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a los antibióticos, tales como neo y similares.

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

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

Los métodos físicos para introducir un polinucleótido en una célula huésped incluyen precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación y similares. Los métodos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en la técnica.

Véase, por ejemplo, Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York). Un método preferido para la introducción de un polinucleótido en una célula huésped es la transfección con fosfato cálcico.

5 Los métodos biológicos para introducir un polinucleótido de interés en una célula huésped incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores virales, y especialmente los vectores retrovirales, se han convertido en el método más ampliamente utilizado para insertar genes en células mamíferas, por ejemplo, humanas. Otros vectores virales pueden derivarse de lentivirus, poxvirus, virus I del herpes simple, adenovirus y virus adeno-
10 asociados, y similares. Véase, por ejemplo, la Pat. 5.350.674 y 5.585.362.

10 Los medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula huésped incluyen sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromolécula, nanocápsulas, microesferas, cuentas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal
15 ejemplar para uso como vehículo de liberación in vitro e in vivo es un liposoma (por ejemplo, una vesícula de membrana artificial).

En el caso en que se utilice un sistema de liberación no viral, un vehículo de liberación ejemplar es un liposoma. El uso de formulaciones de lípidos se contempla para la introducción de los ácidos nucleicos en una célula huésped (in vitro, ex vivo o in vivo). En otro aspecto, el ácido nucleico puede estar asociado con un lípido. El
20 ácido nucleico asociado con un lípido puede estar encapsulado en el interior acuoso de un liposoma, intercalado dentro de la bicapa lipídica de un liposoma, unido a un liposoma a través de una molécula de enlace que está asociada tanto con el liposoma como con el oligonucleótido, atrapado en un liposoma, en un complejo con un liposoma, dispersado en una solución que contiene un lípido, mezclado con un lípido, combinado con un lípido,
25 contenido como suspensión en un lípido, contenido o en un complejo con una micela, o asociado de otro modo con un lípido. Las composiciones asociadas a lípidos, lípidos/ADN o lípidos/vector de expresión no se limitan a ninguna estructura particular en solución. Por ejemplo, pueden estar presentes en una estructura bicapa, como micelas, o con una estructura "colapsada". También pueden intercalarse simplemente en una solución, formando posiblemente agregados que no son uniformes en tamaño o forma. Los lípidos son sustancias grasas que pueden ser lípidos naturales o sintéticos. Por ejemplo, los lípidos incluyen las gotitas grasas que aparecen
30 naturalmente en el citoplasma así como la clase de compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados, tales como ácidos grasos, alcoholes, aminas, aminoalcoholes y aldehídos.

Los lípidos adecuados para su uso pueden obtenerse a partir de fuentes comerciales. Por ejemplo, dimiristil fosfatidilcolina ("DMPC") se puede obtener de Sigma, St. Louis, MO; dicetil fosfato ("DCP") se puede obtener de
35 K & K Laboratories (Plainview, NY); colesterol ("Choi") se puede obtener de Calbiochem-Behring; dimiristil fosfatidilglicerol ("DMPG") y otros lípidos pueden obtenerse de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL). Las soluciones madre de lípidos en cloroformo o cloroformo/metanol se pueden almacenar a aproximadamente -20 ° C. El cloroformo se utiliza como único disolvente ya que se evapora más fácilmente que el metanol. "Liposoma" es un término genérico que abarca una variedad de vehículos lipídicos únicos y multilamelares formados por la
40 generación de bicapas o agregados lipídicos cerrados. Los liposomas pueden caracterizarse por tener estructuras vesiculares con una membrana bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas de lípidos separadas por un medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando se suspenden fosfolípidos en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos sufren un autoreordenamiento antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan el agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh y col., 1991 Glycobiology 5: 505-10). Sin embargo, también se incluyen composiciones que tienen diferentes estructuras en solución que la estructura vesicular normal. Por ejemplo, los lípidos pueden asumir una estructura micelar o simplemente existir como agregados no uniformes de moléculas lipídicas. También se contemplan complejos de lipofectamina-ácido nucleico.

50 Independientemente del método usado para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula huésped o de otra manera exponer una célula al inhibidor de la presente invención, con el fin de confirmar la presencia de la secuencia de ADN recombinante en la célula huésped, se realizaron se pueden realizar una serie de ensayos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de "biología molecular" bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como Southern y Northern blot, RT-PCR y PCR; ensayos bioquímicos, tales como la detección de
55 la presencia o ausencia de un péptido particular, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA y Western blot) o por ensayos descritos en el presente documento para identificar agentes que están dentro del alcance de la invención.

Fuentes de linfocitos T

60 Antes de la expansión y modificación genética de los linfocitos T descritos en el presente documento, se obtiene una fuente de linfocitos T de un sujeto. Los linfocitos T pueden obtenerse de varias fuentes, incluyendo células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglio linfático, sangre de cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido esplénico y tumores. Como se describe
65 aquí, se puede usar cualquier número de líneas de linfocitos T disponibles en la técnica. Los linfocitos T pueden obtenerse a partir de una unidad de sangre recogida de un sujeto utilizando cualquier número de técnicas

conocidas por el experto en la técnica, tales como la separación Ficoll™. Las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen por aféresis. El producto de aféresis contiene típicamente linfocitos, incluyendo linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. Las células recogidas por aféresis se pueden lavar para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un tampón o medio apropiado para las etapas de procesamiento subsiguientes. Las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Alternativamente, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos cationes divalentes si no todos. De nuevo, sorprendentemente, los pasos iniciales de activación en ausencia de calcio conducen a una activación magnificada. Como los expertos ordinarios en la técnica apreciarían fácilmente, se puede lograr una etapa de lavado por métodos conocidos por los expertos en la técnica, tal como utilizando una centrífuga de flujo continuo semiautomática (por ejemplo, el procesador de células Cobe 2991, el Baxter CytoMate, o el Haemonetics Cell Saver 5) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del lavado, las células pueden resuspenderse en una diversidad de tampones biocompatibles, tales como, por ejemplo, libre de Ca²⁺, Mg²⁺ libre de PBS, PlasmaLyte A, u otra solución salina con o sin tampón. Alternativamente, los componentes indeseables de la muestra de aféresis se pueden eliminar y las células se resuspenden directamente en medio de cultivo.

Tal como se describe en el presente documento, los linfocitos T se aíslan a partir de linfocitos de sangre periférica mediante la lisis de los glóbulos rojos y el agotamiento de los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente de PERCOLL™ o por elutriación centrífuga a contracorriente. Una subpoblación específica de linfocitos T, como los linfocitos T CD3⁺, CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ y CD45RO⁺, puede aislarse adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. Por ejemplo, los linfocitos T se aíslan por incubación con cuentas conjugadas anti-CD3/anti-CD28 (es decir, 3x28), tales como DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, durante un periodo de tiempo suficiente para la selección positiva de los linfocitos T deseados, por ejemplo el periodo de tiempo es de aproximadamente 30 minutos, el periodo de tiempo oscila entre 30 minutos a 36 horas o más y todos los valores enteros entre ellos, el período de tiempo es de al menos 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 horas, es de 10 a 24 horas, o el período de tiempo de incubación es de 24 horas. Para el aislamiento de linfocitos T de pacientes con leucemia, el uso de tiempos de incubación más largos, tales como 24 horas, puede aumentar el rendimiento celular. Pueden usarse tiempos de incubación más largos para aislar los linfocitos T en cualquier situación en la que haya pocos linfocitos T en comparación con otros tipos celulares, tales como aislar los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) del tejido tumoral o de individuos inmunocomprometidos. Además, el uso de tiempos de incubación más prolongados puede aumentar la eficacia de la captura de linfocitos T CD8⁺. Por lo tanto, simplemente acortando o alargando el tiempo se deja que los linfocitos T se unan a las cuentas CD3/CD28 y/o aumentando o disminuyendo la relación de cuentas a linfocitos T (como se describe adicionalmente en esta memoria), se pueden seleccionar preferentemente subpoblaciones de linfocitos T para o contra la iniciación de cultivo o en otros puntos de tiempo durante el proceso. Además, aumentando o disminuyendo la relación de anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 sobre las cuentas u otra superficie, se pueden seleccionar preferentemente subpoblaciones de linfocitos T para o contra el inicio del cultivo o en otros puntos temporales deseados. El experto en la técnica reconocerá que también se pueden usar múltiples rondas de selección. Puede ser deseable realizar el procedimiento de selección y utilizar las células "no seleccionadas" en el proceso de activación y expansión. Las células "no seleccionadas" también pueden someterse a nuevas rondas de selección.

El enriquecimiento de una población de linfocitos T mediante selección negativa puede realizarse con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie únicos para las células seleccionadas negativamente. Un método es la clasificación y/o selección de células mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que usa un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4⁺ mediante selección negativa, un anticuerpo monoclonal de anticuerpos incluye típicamente anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8. Puede ser deseable enriquecer o seleccionar positivamente los linfocitos T reguladores que típicamente expresan CD4⁺, CD25⁺, CD62Lhi, GITR⁺ y FoxP3⁺. Alternativamente, los linfocitos T reguladores se agotan mediante cuentas conjugadas con anti-C25 u otro método similar de selección.

Para el aislamiento de una población deseada de células mediante selección positiva o negativa, se puede variar la concentración de células y superficie (por ejemplo, partículas tales como cuentas). Puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que las cuentas y las células se mezclan entre sí (es decir, aumentar la concentración de células), para asegurar el máximo contacto de las células y las cuentas. Por ejemplo, se utiliza una concentración de 2 mil millones de células/ml, se utiliza una concentración de mil millones de células/ml, se utilizan más de 100 millones de células/ml, una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 millones de células/ml, se usa una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml, o pueden usarse concentraciones de 125 ó 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede resultar en un mayor rendimiento celular, activación celular y expansión celular. Además, el uso de altas concentraciones celulares permite una captura más eficiente de células que pueden expresar débilmente antígenos diana de interés, tales como linfocitos T CD28 negativos, o de muestras en las que hay muchas células tumorales presentes (es decir, sangre leucémica, tejido tumoral, etc.). Dichas

poblaciones de células pueden tener un valor terapéutico y sería deseable obtenerlas. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficiente de linfocitos T CD8⁺ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

5 Puede ser deseable utilizar concentraciones de células más bajas. Al diluir significativamente la mezcla de linfocitos T y superficie (por ejemplo, partículas tales como cuentas), se minimizan las interacciones entre las partículas y las células. Esto selecciona células que expresan altas cantidades de antígenos deseados para unirse a las partículas. Por ejemplo, los linfocitos T CD4⁺ expresan niveles más altos de CD28 y se capturan más eficazmente que los linfocitos T CD8⁺ en concentraciones diluidas, por ejemplo, la concentración de células
10 utilizada es de 5×10^6 /ml, o la concentración utilizada puede ser de aproximadamente 1×10^5 /ml a 1×10^6 ml y cualquier valor entero entre ellos.

En otras realizaciones, las células se pueden incubar en un rotador para variar los tiempos a velocidades variables a 2-10°C o a temperatura ambiente.

15 Los linfocitos T para la estimulación también pueden congelarse después de una etapa de lavado. Deseando no estar limitado por la teoría, la congelación y la siguiente etapa de descongelación proporcionan un producto más uniforme eliminando los granulocitos y, en cierta medida, los monocitos en la población celular. Después de la etapa de lavado que elimina el plasma y las plaquetas, las células pueden suspenderse en una solución de congelación. Aunque muchas soluciones y parámetros de congelación son conocidos en la técnica y serán
20 útiles en este contexto, un método implica el uso de PBS que contiene 20% de DMSO y 8% de albúmina de suero humano, o medio de cultivo que contiene 10% de dextrano 40 y dextrosa al 5% albúmina humana y 7,5% de DMSO o 31,25% de Plasmalyte A, 31,25% de dextrosa al 5%, 0,45% de NaCl, 10% de dextrano 40 y 5% de dextrosa, 20% de suero de albúmina humana y 7,5% de DMSO u otro medio de congelación celular adecuado que contiene por ejemplo Hespan y PlasmaLyte A, las células se congelan entonces a -80 °C a una velocidad de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Se pueden utilizar otros métodos de congelación controlado, así como congelación incontrolada inmediatamente a
25 -20 °C o en nitrógeno líquido.

30 Las células crioconservadas se descongelan y lavan como se describe en este documento y se dejan reposar durante una hora a temperatura ambiente antes de la activación usando los métodos de la presente invención. Como se describe en el presente documento, los linfocitos T pueden expandirse, congelarse y utilizarse más tarde. Como se describe en el presente documento, las muestras se recogen de un paciente poco después del diagnóstico de una enfermedad particular como se describe aquí, pero antes de cualquier tratamiento. Las células se aíslan a partir de una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto antes de cualquier número de
35 modalidades de tratamiento relevantes, incluyendo pero no limitándose a tratamiento con agentes tales como natalizumab, efalizumab, agentes antivirales, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoablativos tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3, citoxano, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, e irradiación. Estos fármacos inhiben la calcineurina fosfatasa dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la p70S6 quinasa que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina) (Liu et al., Cell 66: 807-815, 1991; Henderson et al. Immun 73: 316 - 321, 1991, Bierer et al., Curr. Opin., 5: 763-773, 1993). Las células se aíslan para un paciente y se congelan para su uso posterior junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) un trasplante de médula ósea o células madre, terapia con ablación de linfocitos T usando agentes quimioterapéuticos tales como fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida, o anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. Como se describe en el presente documento, las células se aíslan antes y se pueden congelar para su uso posterior en el tratamiento tras la terapia con ablación de linfocitos B, tales como agentes que reaccionan con CD20, por
40 ejemplo, Rituxan.

50 También como se describe en el presente documento, los linfocitos T se obtienen de un paciente directamente después del tratamiento. A este respecto, se ha observado que después de ciertos tratamientos contra el cáncer, en particular tratamientos con fármacos que dañan el sistema inmunológico, poco después del tratamiento durante el período en que los pacientes normalmente se recuperaban del tratamiento, la calidad de
55 los linfocitos T obtenidos puede ser óptima o mejorada por su capacidad para expandirse ex vivo. Del mismo modo, después de la manipulación ex vivo usando los métodos descritos aquí, estas células pueden estar en un estado preferido para un injerto mejorado y una expansión in vivo. Por lo tanto, se contempla dentro del contexto de la presente invención recoger células sanguíneas, incluyendo linfocitos T, células dendríticas u otras células del linaje hematopoyético, durante esta fase de recuperación. Además, se puede utilizar la movilización (por ejemplo, movilización con GM-CSF) y regímenes de acondicionamiento para crear una condición en un sujeto en el que se favorece la repoblación, recirculación, regeneración y/o expansión de tipos celulares particulares, especialmente durante una ventana definida de tiempo después de la terapia. Tipos de células ilustrativas incluyen linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas y otras células del sistema inmune.

65

Activación y expansión de linfocitos T

Ya sea antes o después de la modificación genética de los linfocitos T para expresar un CAR deseable, los linfocitos T pueden activarse y expandirse generalmente usando métodos como los descritos, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 6.352.694; 6.534.055; 6.905.680; 6.692.964; 5.858.358; 6.887.466; 6.905.681; 7.144.575; 7.067.318; 7.172.869; 7.232.566; 7.175.843; 5.883.223; 6.905.874; 6.797.514; 6.867.041; y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 20060121005.

Generalmente, los linfocitos T descritos en el presente documento se expanden por contacto con una superficie que tiene unida al mismo un agente que estimula una señal asociada con el complejo CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de los linfocitos T. En particular, las poblaciones de linfocitos T pueden estimularse como se describe en el presente documento, tal como por contacto con un anticuerpo anti-CD3, o fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD28 inmovilizado sobre una superficie, o por contacto con un activador de la proteína quinasa C (por ejemplo, briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la coestimulación de una molécula accesoria en la superficie de los linfocitos T, se utiliza un ligando que se une a la molécula accesoria. Por ejemplo, puede ponerse en contacto una población de linfocitos T con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en condiciones apropiadas para estimular la proliferación de los linfocitos T. Para estimular la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o linfocitos T CD8⁺, un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Ejemplos de un anticuerpo anti-CD28 incluyen 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diacclone, Besançon, Francia) como pueden usarse otros métodos comúnmente conocidos en la técnica (Berg et al., *Transplant Proc.* 3975 - 3977, 1998. Haanen et al., *J. Exp. Med.* 190 (9): 13191328, 1999, Garland y col., *J. Immunol Meth.* 227 (1-2): 53 - 63, 1999).

La señal estimuladora primaria y la señal coestimuladora para el linfocito T pueden proporcionarse mediante diferentes protocolos. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada señal pueden estar en solución o acoplarse a una superficie. Cuando se acoplan a una superficie, los agentes pueden acoplarse a la misma superficie (es decir, en formación "cis") o a superficies separadas (es decir, en formación "trans"). Alternativamente, un agente puede estar acoplado a una superficie y el otro agente en solución. Por ejemplo, el agente que proporciona la señal coestimuladora está unido a una superficie celular y el agente que proporciona la señal de activación primaria está en solución o acoplado a una superficie, o ambos agentes pueden estar en solución. Alternativamente, los agentes pueden estar en forma soluble, y luego entrelazarse a una superficie, tal como una célula que expresa receptores Fc o un anticuerpo u otro agente aglutinante que se unirá a los agentes. A este respecto, véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente U.S. N° 20040101519 y 20060034810 para células artificiales de presentación de antígenos (aAPC) que se contemplan para su uso en la activación y expansión de linfocitos T.

Como se describe en el presente documento, los dos agentes se inmovilizan en cuentas, ya sea en la misma cuenta, es decir, "cis", o en cuentas separadas, es decir, "trans". A modo de ejemplo, el agente que proporciona la señal de activación primaria es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y el agente que proporciona la señal coestimuladora es un anticuerpo anti-CD28 o fragmento de unión a antígeno del mismo; y ambos agentes se coinmovilizan en la misma cuenta en cantidades moleculares equivalentes. Por ejemplo, se utiliza una relación 1:1 de cada anticuerpo unido a las cuentas para la expansión de linfocitos T CD4⁺ y crecimiento de linfocitos T. En ciertos casos, se utiliza una relación de anticuerpos anti CD3:CD28 unidos a las cuentas de tal manera que se observa un aumento en la expansión de linfocitos T en comparación con la expansión observada usando una relación de 1:1. Se observa un aumento de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 veces en comparación con la expansión observada usando una relación de 1:1. La proporción de anticuerpo CD3:CD28 unido a las cuentas oscila entre 100:1 y 1:100 y todos los valores enteros entre ellos. En un caso, se une más anticuerpo anti-CD28 a las partículas que el anticuerpo anti-CD3, es decir, la relación de CD3:CD28 es menor que uno. En ciertos casos, la relación del anticuerpo anti CD28 al anticuerpo anti-CD3 unido a las cuentas es mayor que 2:1. Por ejemplo, se utiliza una relación de CD3:CD28 de anticuerpo unido a cuentas de 1:100, se utiliza una relación de CD3:CD28 de anticuerpo unido a cuentas de 1:75, se utiliza una relación de CD3:CD28 de anticuerpo unido a cuentas de 1:50, se utiliza una relación de CD3:CD28 de anticuerpo unido a cuentas de 1:30, se utiliza una relación de CD3:CD28 de anticuerpo unido a cuentas de 1:10, o se utiliza una relación de CD3:CD28 de anticuerpo unido a cuentas de 1:3. Alternativamente, se utiliza una relación de CD3:CD28 de anticuerpo unido a cuentas de 3:1.

Para estimular linfocitos T u otras células diana puede utilizarse relaciones de partículas respecto a células entre 1:500 y 500:1 y cualquier valor entero entre ellas. Como los expertos en la técnica pueden apreciar fácilmente, la relación de partículas y células puede depender del tamaño de partícula en relación a la célula diana. Por ejemplo, las cuentas de tamaño pequeño sólo podrán unirse a unas pocas células, mientras que las cuentas más grandes podrían unirse a muchas. La proporción de células respecto a partículas varía entre 1:100 y 100:1 y cualquier valor entero intermedio y en otras realizaciones también puede usarse una relación que comprende de 1:9 a 9:1 y cualquier valor entero entre ellos, para estimular linfocitos T. La proporción de partículas acopladas a CD3 y anti-CD28 a linfocitos T que resultan en la estimulación de linfocitos T puede variar como se ha indicado anteriormente, sin embargo ciertos valores preferidos incluyen 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 y 15:1 siendo una proporción

preferida de al menos 1:1 partículas por linfocito T. Alternativamente, se utiliza una relación de partículas respecto a células de 1:1 o menos. Una proporción de partícula: célula preferida es 1:5. La relación de partículas respecto a células puede variar dependiendo del día de estimulación. Por ejemplo, la relación de partículas respecto a células es de entre 1:1 y 10:1 en el primer día y se añaden partículas adicionales a las células todos los días o cada dos días hasta 10 días después, hasta relaciones finales de entre 1:1 y 1:10 (basado en el recuento de células en el día de adición). Alternativamente, la relación de partículas respecto a células es de 1:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:5 en el tercer y quinto día de estimulación. En otro caso, las partículas se añaden diariamente o cada dos días a una relación final de 1:1 el primer día y 1:5 en el tercer y quinto día de estimulación. En otro caso, la relación de partículas respecto a células es de 2:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:10 en el tercer y quinto día de estimulación. En otro caso, las partículas se añaden diariamente o cada dos días a una relación final de 1:1 el primer día y 1:10 en el tercer y quinto día de estimulación. Un experto en la técnica apreciará que una variedad de otras relaciones puede ser adecuadas para su uso en la presente invención. En particular, las proporciones variarán dependiendo del tamaño de partícula y del tamaño y tipo de célula.

También como se describe en el presente documento, las células, tales como linfocitos T, se combinan con cuentas revestidas con agente, las cuentas y las células se separan posteriormente y, a continuación, se cultivan las células. En una alternativa, antes del cultivo, las cuentas y las células recubiertas de agente no se separan sino que se cultivan juntas. En un caso adicional, las cuentas y las células se concentran primero mediante la aplicación de una fuerza, tal como una fuerza magnética, que da como resultado una ligación aumentada de los marcadores de la superficie celular, induciendo así la estimulación celular.

A modo de ejemplo, las proteínas de la superficie celular pueden ligarse permitiendo que las cuentas paramagnéticas a las que están unidos anti-CD3 y anti-CD28 (cuentas 3x28) se pongan en contacto con los linfocitos T. En una realización, las células (por ejemplo, 10^4 a 10^9 linfocitos T) y cuentas (por ejemplo, cuentas paramagnéticas DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T en una proporción de 1:1) se combinan en un tampón, preferiblemente PBS (sin cationes divalentes tales como calcio y magnesio). De nuevo, los expertos en la técnica pueden apreciar fácilmente cualquier concentración celular que se pueda utilizar. Por ejemplo, la célula diana puede ser muy rara en la muestra y comprender sólo el 0,01% de la muestra o la muestra completa puede comprender la célula diana de interés (es decir, el 100%). Por consiguiente, cualquier número de células está dentro del contexto de la presente invención. Puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que las partículas y las células se mezclan entre sí (es decir, aumentar la concentración de células), para asegurar el máximo contacto de las células y las partículas. Por ejemplo, se utiliza una concentración de aproximadamente 2 mil millones de células/ml. En otro caso, se utiliza más de 100 millones de células/ml. En otro caso, se usa una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 millones de células/ml. En otro caso más, se usa una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 millones de células/ml. En otros casos, se pueden usar concentraciones de 125 ó 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede resultar en un mayor rendimiento celular, activación celular y expansión celular. Además, el uso de altas concentraciones celulares permite una captura más eficiente de células que pueden expresar débilmente antígenos diana de interés, tales como linfocitos T negativos para CD28. Tales poblaciones de células pueden tener un valor terapéutico y sería deseable obtenerlos en ciertas realizaciones. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficiente de linfocitos T CD8⁺ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

La mezcla puede cultivarse durante varias horas (aproximadamente 3 horas) hasta aproximadamente 14 días o cualquier valor entero por hora entre las dos. La mezcla puede cultivarse durante 21 días. En un caso, las cuentas y los linfocitos T se cultivan juntos durante aproximadamente ocho días. En otro caso, las cuentas y los linfocitos T se cultivan juntos durante 2-3 días. También se pueden desear varios ciclos de estimulación de tal manera que el tiempo de cultivo de los linfocitos T pueda ser de 60 días o más. Las condiciones apropiadas para el cultivo de linfocitos T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, medio mínimo esencial o medio RPMI 1640 o X-vivo 15, (Lonza)) que puede contener factores necesarios para la proliferación y viabilidad, incluyendo suero (por ejemplo, bovino fetal o suero humano), interleuquina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β y TNF- α u otros aditivos para el crecimiento de células conocidas por el experto en la técnica. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, pero no se limitan a, surfactante, plasmanato y agentes reductores tales como N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos añadidos, piruvato sódico y vitaminas, o suplementado con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citoquinas suficiente para el crecimiento y expansión de linfocitos T. Los antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomina, se incluyen sólo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que han de ser infundidas en un sujeto. Las células diana se mantienen en las condiciones necesarias para soportar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura apropiada (por ejemplo, 37°C) y atmósfera (por ejemplo, aire más 5% de CO₂).

Los linfocitos T que han estado expuestos a tiempos de estimulación variados pueden presentar características diferentes. Por ejemplo, los productos de células mononucleares de sangre periférica o de sangre periférica típica tienen una población de linfocitos T auxiliar (TH, CD4⁺) que es mayor que la población de linfocitos T

5 citotóxicos o supresores (TC, CD8⁺). La expansión ex vivo de los linfocitos T estimulando los receptores CD3 y CD28 produce una población de linfocitos T que antes de los días 8-9 está constituida predominantemente por linfocitos T_H, mientras que después de los días 8-9 la población de linfocitos T comprende una población cada vez mayor de los linfocitos T_C. Por consiguiente, dependiendo del propósito del tratamiento, puede ser ventajoso
 10 infundir a un sujeto con una población de linfocitos T que comprende predominantemente linfocitos T_H. De forma similar, si se ha aislado un subconjunto específico de antígeno de linfocitos T_C, puede ser beneficioso expandir este subconjunto a un mayor grado.

10 Adicionalmente, además de los marcadores CD4 y CD8, otros marcadores fenotípicos varían significativamente, pero en gran parte, de forma reproducible durante el curso del proceso de expansión celular. Por lo tanto, tal reproducibilidad permite la capacidad de adaptar un producto de linfocitos T activado para propósitos específicos.

15 Aplicación terapéutica

15 Se describe aquí una célula (por ejemplo, un linfocito T) transducida con un vector lentiviral (LV). Por ejemplo, el LV codifica un CAR que combina un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico con un dominio intracelular de CD3-zeta y 4-1BB. Por lo tanto, en algunos casos, el linfocito T transducido puede
 20 provocar una respuesta de linfocitos T mediada por CAR.

20 La invención proporciona el uso de un CAR como se define en las reivindicaciones para redirigir la especificidad primaria de un linfocito T a un antígeno tumoral. Por lo tanto, también se describe en el presente documento un método para estimular una respuesta inmune mediada por linfocitos T a una población o tejido de células diana en un mamífero que comprende la etapa de administrar al mamífero un linfocito T que expresa un CAR, que
 25 interactúa específicamente con un objetivo predeterminado, una porción de cadena zeta que comprende, por ejemplo, el dominio intracelular de CD3 zeta humana y una región de señalización coestimuladora.

30 Se describe aquí un tipo de terapia celular en la que los linfocitos T se modifican genéticamente para expresar un CAR y el linfocito T CAR se infunde a un receptor que lo necesita. La célula infundida es capaz de destruir células tumorales en el receptor. A diferencia de las terapias con anticuerpos, los linfocitos T CAR son capaces de replicarse in vivo dando como resultado una persistencia a largo plazo que puede conducir al control sostenido del tumor.

35 Los linfocitos T CAR descritos en este documento pueden sufrir una fuerte expansión de linfocitos T in vivo y pueden persistir durante un periodo prolongado de tiempo. En otra realización, los linfocitos T CAR descritos en este documento evolucionan hacia linfocitos T de memoria específicos que pueden reactivarse para inhibir cualquier formación o crecimiento tumoral adicional. Por ejemplo, era inesperado que las células CART 19
 40 descritas en el presente documento pudieran experimentar una fuerte expansión de linfocitos T in vivo y persistir a altos niveles durante un periodo prolongado de tiempo en sangre y médula ósea y formar linfocitos T de memoria específicos. Sin desear estar limitados por ninguna teoría particular, los linfocitos T CAR pueden diferenciarse in vivo en un estado central similar a la memoria al encontrarse y eliminar posteriormente a las células diana que expresan el antígeno sustituto.

45 Sin desear estar limitado por ninguna teoría particular, la respuesta de inmunidad antitumoral provocada por los linfocitos T CAR modificados puede ser una respuesta inmune activa o pasiva. Además, la respuesta inmune mediada por CAR puede ser parte de un enfoque de inmunoterapia adoptiva en el que los linfocitos T modificados con CAR inducen una respuesta inmune específica a la porción de unión al antígeno en el CAR. Por ejemplo, las células CART19 provocan una respuesta inmune específica contra células que expresan CD19.

50 Aunque los datos revelados en el presente documento describen específicamente un vector lentiviral que comprende un scFv anti-CD19 derivado del anticuerpo monoclonal murino FMC63, bisagra CD8 α humano y dominio transmembrana, y dominios de señalización 4-1BB y CD3 zeta humanos, la invención debe interpretarse que incluye cualquier número de variaciones para cada uno de los componentes de la construcción como se describe en otra parte del presente documento.

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

65 Los cánceres hematológicos son cánceres de la sangre o de la médula ósea. Ejemplos de cánceres hematológicos (o hematógenos) incluyen leucemias, incluyendo leucemias agudas (tales como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y mieloblástica, promielocítica,

mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (tales como leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (formas indolentes y de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada, síndrome mielodisplásico, leucemia de células pilosas y mielodisplasia.

Los tumores sólidos son masas anormales de tejido que usualmente no contienen quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos. Los diferentes tipos de tumores sólidos se denominan por el tipo de células que los forman (como sarcomas, carcinomas y linfomas). Ejemplos de tumores sólidos, como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, osteosarcoma y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, malignidad linfoide, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma de la glándula sudorípara, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, carcinoma de glándula sebácea de feocromocitomas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conducto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga, melanoma y tumores del SNC (como el glioma (como el glioma del tronco encefálico y los gliomas mixtos), glioblastoma (también conocido como glioblastoma multiforme) astrocitoma, linfoma del SNC, germinoma, meduloblastoma, craneofariangioma de Schwannoma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, neuroblastoma, retinoblastoma y metástasis cerebrales).

El CAR diseñado para dirigirse al CD 19 puede usarse para tratar cánceres y trastornos que incluyen, pero no se limitan a LLA pre-B (indicación pediátrica), LLA en adulto, linfoma de células del manto, linfoma difuso de linfocitos B grandes, trasplante de médula ósea, y similares.

Los linfocitos T CAR modificados descritos aquí también pueden servir como un tipo de vacuna para inmunización ex vivo y/o terapia in vivo en un mamífero. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

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

Los procedimientos ex vivo son bien conocidos en la técnica y se discuten más completamente a continuación. En pocas palabras, las células se aíslan de un mamífero (preferiblemente un humano) y se modifican genéticamente (es decir, transducen o transfectan in vitro) con un vector que expresa un CAR descrito en el presente documento. La célula con el CAR modificado se puede administrar a un receptor de mamífero para proporcionar un beneficio terapéutico. El mamífero receptor puede ser un ser humano y la célula con el CAR modificado puede ser autóloga con respecto al receptor. Alternativamente, las células pueden ser alogénicas, singénicas o xenogénicas con respecto al receptor.

El procedimiento para la expansión ex vivo de células madre y progenitoras hematopoyéticas descrito en la patente U.S. Nº 5.199.942, se puede aplicar a las células de la presente invención. Otros métodos adecuados son conocidos en la técnica, por lo tanto, la presente invención no se limita a ningún método particular de expansión ex vivo de las células. Brevemente, el cultivo ex vivo y la expansión de linfocitos T comprende: (1) recolectar células madre y progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ de un mamífero procedente de sangre periférica recogida o explantes de médula ósea; y (2) expandir dichas células ex vivo. Además de los factores de crecimiento celular descritos en la patente US 5.199.942, se pueden usar otros factores tales como flt3-L, IL-1, IL-3 y ligando c-kit, para el cultivo y la expansión de las células.

Además de usar una vacuna basada en células en términos de inmunización ex vivo, la presente descripción también proporciona composiciones y métodos para la inmunización in vivo para provocar una respuesta inmune dirigida contra un antígeno en un paciente.

En general, las células activadas y expandidas como se describe en el presente documento pueden utilizarse en el tratamiento y prevención de enfermedades que aparecen en individuos inmunocomprometidos. En particular, los linfocitos T CAR modificados descritos aquí se usan en el tratamiento de la LLC. En ciertas realizaciones, las células descritas aquí se usan en el tratamiento de pacientes en riesgo de desarrollar LLC. Por tanto, la presente descripción proporciona el tratamiento o la prevención de LLC que comprende administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de los linfocitos T CAR modificados de la invención.

Los linfocitos T CAR modificados descritos en la presente invención pueden administrarse solos o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes tales como IL-2 u otras citoquinas o poblaciones de células. Brevemente, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden comprender una población de células diana tal como se describe en el presente documento, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente o fisiológicamente

aceptables. Dichas composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones descritas en la presente invención se formulan preferiblemente para administración intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente invención pueden administrarse de una manera apropiada a la enfermedad a tratar (o prevenir). La cantidad y frecuencia de administración se determinará por factores tales como la condición del paciente, y el tipo y gravedad de la enfermedad del paciente, aunque las dosificaciones apropiadas pueden determinarse mediante ensayos clínicos.

Cuando se indica "una cantidad inmunológicamente eficaz", "una cantidad antitumoral eficaz", "una cantidad inhibidora de tumor eficaz" o "cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones de la presente invención a administrar puede ser determinada por un médico teniendo en cuenta las diferencias individuales en edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis, y estado del paciente (sujeto). Generalmente se puede afirmar que una composición farmacéutica que comprende los linfocitos T descritos en el presente documento puede administrarse a una dosis de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, preferiblemente de 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores enteros dentro de estos intervalos. Las composiciones de linfocitos T también pueden administrarse varias veces a estas dosificaciones. Las células pueden administrarse utilizando técnicas de infusión que se conocen comúnmente en inmunoterapia (véase, por ejemplo, Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319: 1676, 1988). La dosis óptima y el régimen de tratamiento para un paciente particular pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica de la medicina mediante la monitorización del paciente para detectar signos de la enfermedad y ajustar el tratamiento en consecuencia.

Puede ser deseable administrar linfocitos T activados a un sujeto y posteriormente extraer sangre (o tener una aféresis realizada), activar linfocitos T de acuerdo con la presente invención, y reinfundir al paciente con estos linfocitos T activados y expandidos. Este proceso se puede llevar a cabo varias veces cada pocas semanas. Los linfocitos T pueden activarse a partir de muestras de sangre de 10cc a 400cc, por ejemplo, los linfocitos T se activan a partir de extracciones sanguíneas de 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc o 100cc. Para no estar limitado por la teoría, el uso de este protocolo de extracción múltiple /reinfusión sanguínea múltiple puede servir para seleccionar ciertas poblaciones de linfocitos T.

La administración de las presentes composiciones puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, incluyendo por inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, intravenosa (i.v.) o intraperitoneal. Por ejemplo, las composiciones de linfocitos T descritas en el presente documento se administran a un paciente mediante inyección intradérmica o subcutánea. En otro ejemplo, las composiciones de linfocitos T descritas en el presente documento se administran preferiblemente mediante inyección i.v.. Las composiciones de linfocitos T pueden inyectarse directamente en un tumor, un ganglio linfático o un sitio de infección.

En ciertos casos, las células activadas y expandidas usando los métodos descritos en el presente documento, u otros métodos conocidos en la técnica en donde los linfocitos T se expanden a niveles terapéuticos, se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, incluyendo pero no limitándose a tratamiento con agentes tales como terapia antiviral, cidofovir e interleuquina-2, tratamiento con citarabina (también conocido como ARA-C) o natalizumab para pacientes con EM o tratamiento con efalizumab para pacientes con psoriasis u otros tratamientos para pacientes con LMP. También se describen en este documento, los linfocitos T de la invención pueden usarse en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos, u otros agentes inmunoablativos tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias de anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citoquinas e irradiación. Estos fármacos inhiben la calcineurina fosfatasa dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la quinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina) (Liu et al., *Cell* 66: 807-815, 1991; Henderson et al. *Immun* 73: 316 - 321, 1991, Bierer et al., *Curr. Opin. Immun.*, 5: 763 - 773, 1993). Las composiciones celulares de la presente invención se administran también a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) del trasplante de médula ósea, terapia con ablación de linfocitos T utilizando agentes de quimioterapia tales como, fludarabina, terapia de radiación de haz externo (XRT), ciclofosfamida, o anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. También se describen en el presente documento, las composiciones celulares de la presente invención se administran después de la terapia ablativa de linfocitos B, tales como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, los sujetos pueden someterse a un tratamiento estándar con quimioterapia en dosis altas seguida por trasplante de células madre de sangre periférica. En ciertos casos, después del trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunes expandidas de la presente invención, o las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

La dosificación de los tratamientos anteriores a administrar a un paciente variará con la naturaleza precisa de la afección que se está tratando y del receptor del tratamiento. El escalamiento de dosificaciones para administración humana puede realizarse de acuerdo con prácticas aceptadas en la técnica. La dosis para CAMPATH, por ejemplo, estará generalmente en el intervalo de 1 a aproximadamente 100 mg para un paciente adulto, usualmente administrado diariamente durante un periodo entre 1 y 30 días. La dosis diaria preferida es de 1 a 10 mg por día, aunque en algunos casos pueden utilizarse dosis mayores de hasta 40 mg por día (descritas en la patente US N° 6.120.766).

Ejemplos experimentales

La invención se describe adicionalmente con detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos únicamente, y no se pretende que sean limitativos a menos que se especifique lo contrario. Por lo tanto, la invención no debe interpretarse en modo alguno por estar limitada a los siguientes ejemplos, sino que debe ser interpretada para abarcar todas y cada una de las variaciones que resultan evidentes como resultado de la enseñanza proporcionada en este documento.

Sin más descripción, se cree que un experto en la técnica puede, usando la descripción precedente y los siguientes ejemplos ilustrativos, fabricar y utilizar los compuestos de la presente invención y practicar los métodos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo, por lo tanto, señalan específicamente las realizaciones preferidas de la presente invención, y no deben ser interpretados como limitativos de ninguna manera del resto de la descripción.

Ejemplo 1: Linfocitos T que expresan receptores quiméricos establecen memoria y potentes efectos antitumorales en pacientes con leucemia avanzada

Los linfocitos manipulados para expresar receptores de antígenos quiméricos (RAC) han demostrado una expansión in vivo mínima y efectos antitumorales en ensayos clínicos previos. Los resultados presentados en este documento demuestran que los linfocitos T CAR que contienen CD137 tienen una actividad clínica potente, no cruzada, después de la infusión en tres de tres pacientes tratados con leucemia linfocítica crónica avanzada (LLC). Los linfocitos T modificados se expandieron más de mil veces in vivo, enviados a la médula ósea y continuaron expresando CAR funcionales a niveles altos durante al menos 6 meses. En promedio, cada célula CAR⁺ infundida erradicó al menos 1000 células LLC. Se demostró una respuesta inmune específica de CD19 en la sangre y la médula ósea, acompañada de remisión completa en dos de tres pacientes. Una parte de las células persisten como linfocitos T CAR⁺ de memoria, lo que indica el potencial de este enfoque no restringido a MHC para el tratamiento eficaz de las neoplasias malignas de linfocitos B.

Los materiales y métodos empleados en estos experimentos se describen ahora.

Materiales y Métodos

Procedimientos generales del laboratorio

El procesamiento de muestras de investigación, la congelación y los análisis de laboratorio se realizaron en el Laboratorio de Estudios Correlacionales y Traduccionales de la Universidad de Pensilvania, que opera bajo los principios de Buenas Prácticas de Laboratorio con PNT y/o protocolos establecidos para la recepción, procesamiento, congelación y análisis de muestras. El rendimiento de los ensayos y la información de los datos son conformes con las directrices de MIATA (Janetzki et al., 2009, Immunity 31: 527-528).

Diseño del protocolo

El ensayo clínico (NCT01029366) se realizó como se muestra en la Figura 1. Los pacientes con neoplasia hematológica CD19 positiva con enfermedad persistente después de al menos dos regímenes de tratamiento previos y que no eran elegibles para el trasplante alogénico de células madre fueron elegibles para el ensayo. Tras la reestadificación del tumor, los linfocitos T de sangre periférica para la fabricación de CART19 se recogieron por aféresis y los sujetos recibieron un solo ciclo de quimioterapia como se especifica en la Figura 10 durante la semana anterior a la infusión. Las células CART19 se administraron por infusión intravenosa usando un régimen de dosis divididas de 3 días (10%, 30% y 60%) a la dosis indicada en la Figura 10 y, si estaba disponible, se administró una segunda dosis al día 10; sólo el paciente UPN 02 tenía células suficientes para una segunda infusión. Los sujetos fueron evaluados para la toxicidad y la respuesta a intervalos frecuentes durante al menos 6 meses. El protocolo fue aprobado por la administración de alimentos y medicamentos (FDA) de los Estados Unidos, el comité consultivo sobre ADN recombinante y la junta de revisión institucional de la Universidad de Pensilvania. El primer día de infusión se estableció como día de estudio 0.

Sujetos: resumen clínico

Los resúmenes clínicos se describen en la Figura 10 y se proporcionan historiales detallados en otra parte del presente documento. El paciente UPN 01 fue diagnosticado por primera vez con LLC de linfocitos B en estadio II a los 55 años. El paciente estaba asintomático y se observó aproximadamente durante 1-1/2 años hasta requerir tratamiento para linfocitosis progresiva, trombocitopenia, adenopatía y esplenomegalia. Con el transcurso del tiempo, el paciente recibió terapia de primera línea. La terapia más reciente fue de 2 ciclos de pentostatina, ciclofosfamida y rituximab 2 meses antes de la infusión de células CART19 con una respuesta mínima. A continuación, el paciente recibió un ciclo de bendamustina como quimioterapia de linfoplastia antes de la infusión de células CART-19.

El paciente UPN 02 fue diagnosticado por primera vez con LLC a los 68 años cuando el paciente se presentó con fatiga y leucocitosis. El paciente se mantuvo relativamente estable durante 4 años cuando el paciente desarrolló leucocitosis progresiva ($195.000/\mu\text{l}$), anemia y trombocitopenia que requirieron terapia. El análisis cariotípico mostró que las células LLC tenían delección del cromosoma 17p. Debido a la enfermedad progresiva, el paciente fue tratado con alemtuzumab con una respuesta parcial, pero al cabo de un año y medio el paciente tenía enfermedad progresiva. El paciente se retrató con alemtuzumab durante 18 semanas con una respuesta parcial y un intervalo libre de progresión de 1 año. A continuación, el paciente recibió 2 ciclos de bendamustina con rituximab sin una respuesta significativa (Figura 5A). El paciente recibió bendamustina como agente único de quimioterapia de linfoplastia antes de la infusión de células CART-19.

El paciente UPN 03 debutó a la edad de 50 con LLC asintomática en estadio I y estuvo en observación durante años. El paciente desarrolló leucocitosis progresiva (recuento de glóbulos blancos $92.000/\mu\text{l}$) y adenopatía progresiva que requirió terapia. El paciente recibió 2 ciclos de rituximab con fludarabina que resultó en la normalización de los recuentos sanguíneos y mejoría significativa, aunque no completa resolución en la adenopatía. El paciente presentó un intervalo libre de progresión de aproximadamente 3 años. Las pruebas cariotípicas mostraron que las células contenían la delección del cromosoma 17p con FISH que demuestra una delección de TP53 en 170 de 200 células. Durante los siguientes años, el paciente requirió 3 líneas diferentes de terapia (Figura 10) para la leucocitosis progresiva y la adenopatía, la última vez recibió alemtuzumab con una respuesta parcial 6 meses antes de la infusión de células CART19. El paciente recibió pentostatina y ciclofosfamida como quimioterapia de linfoplastia antes de la infusión de células CART-19.

Producción de vectores

El transgén CD19-BB-z (GeMCRIS 0607-793) fue diseñado y construido como se ha descrito (Milone et al., 2009, *Mol Ther.* 17: 1453-1464). El vector lentiviral se produjo de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación actuales usando un enfoque de producción de tres plásmidos en Lentigen Corporation como se describe (Zufferey et al., 1997, *Nature biotechnol* 15: 871-875).

Preparación del producto celular CART19

Se han descrito métodos de preparación de linfocitos T utilizando cuentas de poliestireno paramagnético recubiertas con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 (Laport et al., 2003, *Blood* 102: 2004-2013). La transducción lentiviral se realizó como se ha descrito (Levine et al., 2006, *Proc Natl Acad Sci. U.S A* 103: 17372-17377).

Métodos para el cálculo de la carga tumoral

La carga de LLC en la línea basal se estimó como se muestra en la Figura 10. La cantidad de células LLC se calcularon en médula ósea, sangre y tejidos linfoides secundarios como se describe a continuación.

Médula ósea En adultos sanos, la médula ósea representa aproximadamente el 5% del peso corporal total (Woodard et al., 1960, *Phys Med Biol*, 5: 57-59, Bigler et al., 1976, *Health Phys* 31: 213-218). La médula ósea en muestras de crestas ilíaca tiene un porcentaje creciente de médula inactiva (grasa) con la edad, pasando del 20% de la médula ósea total a los 5 años a alrededor del 50% a los 35 años, cuando permanece estable hasta los 65 años, hasta aproximadamente 67% de médula inactiva a los 75 años (Hartsock et al., 1965, *Am J Clin Path* 43: 326 - 331). El valor de referencia internacional del peso total del esqueleto de la médula activa (roja) e inactiva (grasa) de los varones a los 35 años se fija actualmente en 1170g y 2480g, respectivamente (datos anatómicos y fisiológicos básicos para uso en protección radiológica: *The Skeleton in Annals of the ICRP*, Vol. 25 (ed. Smith, H.) 58-68 (Informe de un grupo de trabajo del comité 2 de la comisión internacional de protección radiológica, Oxford, 1995)). Los varones adultos de entre 35 y 65 años tienen médula que representa un 5,0% del peso corporal total, compuesto de 1,6% de médula activa (roja) y 3,4% de médula inactiva (grasa) (Datos anatómicos y fisiológicos básicos para protección radiológica: *The Skeleton in Annals of the ICRP*, Vol. 25 (ed. Smith, H.) 58-68 (Informe de un grupo de trabajo del comité 2 de la comisión internacional de protección radiológica, Oxford, 1995)). Basándose en la biopsia de médula ósea y las muestras de aspiración, se calculó el peso de células LLC para los tres pacientes en la línea basal como se muestra en la Tabla 1. Estas

5 estimaciones de la masa de médula LLC total se convirtieron al número de células LLC totales en la médula usando $1\text{Kg} = 10^{12}$ células, y los números resultantes se muestran en la Figura 10. Estos cálculos se basan en el supuesto de que la LLC tiene una distribución uniforme en la médula ósea. Para el paciente UPN 01, los cálculos se muestran para una biopsia de médula ósea que se obtuvo antes de la quimioterapia con bendamustina, y para un aspirado obtenido después de la bendamustina y la infusión de pre-CART19. Los números son menos precisos para el aspirado del día-1 en comparación con el espécimen de la biopsia del día-14 debido a limitaciones técnicas del aspirado del día-1. El paciente UPN 02 tenía una única muestra de biopsia previa al tratamiento que mostraba la sustitución completa de la médula por LLC. Este paciente tenía un espécimen sin cambios en el día 30 tras CART19. La carga de médula para el paciente UPN 03 se calculó sobre la base de una biopsia post-quimioterapia y pre-CART19.

Tabla 1: Masa de médula

	Peso de médula activa (kg)	Peso de médula inactiva (kg)	Médula total (kg)
Varones normales (estándar de referencia ICRP)	1,17	2,48	3,65
UPN 01 día-14 (95% celular)	3,47	0,18	3,65
UPN 02 día-47 (95% celular)	3,47	0,18	3,65
UPN 03 día-1 (60% celular)	2,19	1,46	3,65
Peso de LLC (kg)			
UPN 01 día-14 (70% LLC)	2,43		
UPN 01 día-1 (50% LLC por coágulo)	1,73		
UPN 02 día-47 (>95% LLC)	3,29		
UPN 03 día-1 (40% LLC)	0,88		

15 Sangre: Sólo el paciente UPN 02 tenía una carga tumoral de LLC sustancial en la sangre antes de la infusión de CART19. La citometría de flujo mostró que las células tenían un fenotipo típico como una población clonal con una población de linfocitos B IgM CD5+ CD10- CD19+ CD20(dim)+ CD23(variable)+ restringida a kappa, débil en superficie. Aproximadamente el 35% de las células LLC coexpresaron CD38. La carga de LLC no se aclaró con 3 ciclos de quimioterapia con bendamustina y estuvo presente en el momento de las infusiones de CART19. En el momento de la infusión de CART 19, el recuento de LLC en la sangre era de 55.000 células/ μL .

20 Suponiendo un volumen sanguíneo de 5,0 L, el paciente UPN 02 tenía $2,75 \times 10^{11}$ células LLC en sangre en el día 0. Dado el número normal total de células blancas en los pacientes UPN 01 y 03, la carga de la enfermedad circulante en estos pacientes no se calculó, lo que conduciría a una ligera subestimación de la carga corporal total.

25 Tejidos linfoides secundarios: El volumen de linfadenopatía y esplenomegalia se cuantificó en tomografías computarizadas axiales usando un programa aprobado por la FDA. Los volúmenes son sólo para el pecho, el abdomen y la pelvis. Las masas del cuerpo vertebral T1 al nivel de la bifurcación de la arteria femoral común se midieron en todos los pacientes y en algunos se incluyeron también los ganglios en el área inguinal. Los ganglios en la cabeza/cuello y las extremidades se excluyeron del análisis y se excluyeron del número de células diana LLC de base, lo que también conduciría a una leve subestimación de la carga corporal total. Los pacientes UPN 01 y 03 han tenido remisiones completas sostenidas más allá de 6 meses y, por lo tanto, se utilizó la fórmula (volumen basal - volumen mes 3) para determinar la reducción de la carga tumoral desde la línea basal; el paciente UPN 02 tuvo una enfermedad estable en la adenopatía y, por lo tanto, la masa tumoral basal se calcula restando el volumen esplénico de referencia de varones sanos con la misma edad (Harris et al., 2010, Eur J Radiol 75: e97-e101). La masa tumoral basal se convirtió en células LLC usando una densidad de aproximación (1 Kg/L de densidad y $1\text{ Kg} = 10^{12}$ células) o un enfoque de volumen (las células LLC tienen 10 μM de diámetro o 600 fL, suponiendo una forma esférica) y ambos valores se presentan en la Figura 10. Los volúmenes de tumores en los tejidos linfoides secundarios en los tres pacientes se muestran a continuación en la Tabla 2 según se calculó a partir de las tomografías computarizadas disponibles.

Tabla 2: Volúmenes tumorales

Paciente	Día en estudio	Volumen NL (mm3)	Volumen bazo (mm3)	Volumen total (mm3)
UPN 01	-37	239655	1619180	1858835
	1 mes	105005	1258575	1363580
	3 mes	65060	1176625	1241685
UPN 02	-24	115990	1166800	1282790
	1 mes	111755	940960	1052715
UPN 03	-10	239160	435825	674985
	1 mes	111525	371200	482725
	3 mes	47245	299860	347105

La tomografía computarizada de referencia para el paciente UPN 01 se realizó 8 días después de 2 ciclos de pentostatina/ciclofosfamida/rituximab y no mostró respuesta a este régimen de quimioterapia en comparación con la tomografía computarizada previa. El paciente tuvo un ciclo de bendamustina antes de CART 19 y, por lo tanto, el cambio en el volumen tumoral del día-37 al día +31 para UPN 01 no puede excluir la contribución potencial de la bendamustina, así como CART19. Del mismo modo, el cambio en el volumen tumoral de UPN 03 refleja el efecto combinado de 1 ciclo de pentostatina/ciclofosfamida y CART19.

Método para estimar la proporción efectiva E:T in vivo en pacientes

Se calculó la relación E:T de linfocitos T CAR en infusión con el número de células tumorales muertas usando el número de células tumorales presentes en el momento de la inyección de linfocitos T CAR y el número de linfocitos T CAR inyectados (Carpenito et al., 2009, Proc. Natl Acad Sci USA 106: 3360-3365). Para la presente invención, se utilizó el número de linfocitos T CART19+ inyectados como se muestra en la Figura 10 porque no es posible determinar el número absoluto de linfocitos T CART19+ presentes in vivo con precisión o precisión suficiente. Los datos disponibles sobre la expansión de CART19 en la sangre y la médula ósea son robustos, como se muestra en la Figura 2 y la Figura 6. Sin embargo, no fue posible determinar el tráfico de CART19 a otros sitios como los tejidos linfoides secundarios, creando una incertidumbre sustancial sobre el número total de células CART19 logradas in vivo en el momento de la reducción máxima del tumor. Los valores calculados de la Tabla 3 se utilizaron para derivar las relaciones efectivas E:T.

Tabla 3: Proporciones E:T de CART19 calculadas in vivo

Paciente	Carga tumoral (línea basal y Delta)				células CART19+ infundidas	E:T in vivo
	Médula ósea línea basal	Sangre línea basal	Nódulos/bazo ¹ línea basal	cambio total en la carga de LLC		
UPN 01	1,7E+12	N/A	8,1E+11	2,51E+12	1,13E+09	1:2200
UPN 02	3,20E+12	2,75E+11	1,6E+12	2,74E+11 ²	5,80E+8	1:1000
UPN 03	8,80E+11	N/A	4,4E+11	1,32E+12	1,42E+07	1:93000
Rango 1000-93000						
1= media de la densidad y volumen del método 2= el paciente UPN02 no respondió en la médula ósea y tuvo una reducción parcial en la adenopatía (3,1E+11 células) en las masas tumorales medidas mediante tomografía en el bazo y nódulos linfáticos. Ver Figura 5 ^a para la respuesta en sangre.						

Procesamiento y congelación de muestras

Se recogieron muestras (sangre periférica, médula ósea) en tubos vacutainer de tapa de lavanda (K2EDTA) o rojo top (sin aditivos) de (Becton Dickinson) y se suministraron a la TCSL dentro de las 2 horas de extracción. Las muestras se procesaron dentro de los 30 minutos siguientes a su recepción según se establece en el PNT del laboratorio. La sangre periférica y las células mononucleares de médula ósea se purificaron mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll usando Ficoll-Paque (GE Healthcare, 17-1440-03) y se congelaron en RPMI (Gibco 11875-135) suplementado con albúmina de suero humano al 4% (Gemini Bio-Products, 800 - 120°C), 2% de Hetastarch (Novaplus, NDC0409 - 7248 - 49) y 10% de DMSO (Sigma, D2650) usando recipientes de congelación 1° 5100 Cryo; después de 24-72 horas a -80 °C, las células fueron transferidas a nitrógeno líquido para el almacenamiento a largo plazo. Las muestras de aféresis se obtuvieron a través del banco de sangre del Hospital de la Universidad de Pennsylvania y se procesaron en la CVPF mediante gradación de gradiente de Ficoll y se congelaron como se ha explicado anteriormente. La viabilidad inmediatamente después del descongelamiento fue superior al 85% cuando se evaluó. Para el aislamiento del suero, las muestras se dejaron coagular durante 1,5-2 horas a temperatura ambiente; el suero se aisló por centrifugación y se congelaron alícuotas de 100 µl de un solo uso a -80 °C,

Líneas celulares

Se obtuvo K562 (CML, CD19 negativo) a partir de ATCC (CCL-243), K562/CD19, una generosa donación de Carmine Carpenito, y es transducido con lentivirus K562 a 100% de frecuencia para expresar la molécula CD19. NALM-6, una línea de linfocitos B precursoras CD19 positivas ALL no-B, no-T (Hurwitz et al., 1979, Int J Cancer 23: 174-180) con expresión confirmada del antígeno CD19 fue una generosa donación de Laurence Cooper. Las líneas celulares anteriores se mantuvieron en medio R10 (RPMI 1640 (Gibco, 11875) suplementado con suero bovino fetal al 10% (Hyclone) y 1% Pen-Strep (Gibco, 15140-122). Las células mononucleares periféricas (ND365) de un donante sano se obtuvieron por aféresis del núcleo de inmunología humana en la Universidad de Pensilvania, procesadas y congeladas como se ha explicado anteriormente.

Aislamiento de DNA y análisis mediante Q-PCR

Se recogieron muestras de sangre total o médula en tubos de vacutainer de lavanda top BD (K3EDTA) de (Becton Dickinson). El ADN genómico se aisló directamente de la sangre entera usando los equipos QIAamp DNA blood midi (Qiagen) y mediante los PNT de laboratorio, cuantificado por espectrofotómetro, y almacenado a -80°C . El análisis Q-PCR en muestras de ADN genómico se realizó a granel utilizando 123-200 ng de ADN genómico/punto de tiempo, tecnología ABI Taqman y un ensayo validado para detectar la secuencia transgén CD19 CAR integrada. Los intervalos de parámetros de paso/fallo, incluyendo los valores de la pendiente de la curva estándar y los valores r^2 , la capacidad de cuantificar con precisión una muestra de referencia (1000 copias/pico de plásmido) y ninguna amplificación en la muestra de ADN de donante sano se calcularon a partir de los estudios de calificación y rangos de aceptación preestablecidos. Los cebadores/sondas para el transgén de CD19 CAR fue como se describió (Milone et al., 2009, Mol Ther 17: 1453 - 1464). Para determinar el número de copias/unidad de ADN se generó una curva estándar de 8 puntos que constaba de 10^6 -5 copias de plásmido de lentivirus introducido en 100 ng de ADN genómico de control no transformado. Cada punto de datos (muestras, curva estándar, muestras de referencia) se evaluó por triplicado con los valores medios descritos. Para el paciente UPN 01, todos los valores descritos derivaron de un valor de Ct positivo en 3/3 réplicas con % CV inferior al 0,46%. Para el paciente UPN 02, con la excepción de la muestra de día +177 (2/3 repeticiones positivas, alto % de CV), todos los valores descritos derivaron de un valor de Ct positivo en 3/3 réplicas con % CV inferior al 0,72%. Para el paciente UPN 03, con la excepción de la muestra de día +1 (2/3 repeticiones positivas, 0,8 % de CV) y las muestras del día +3 (2/3 réplicas positivas, 0,67 % de CV), todos los valores descritos derivaron de un valor Ct positivo en 3/3 réplicas con % de CV inferior al 1,56%. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) para el ensayo se determinó a partir de la curva estándar a 2 copias/microgramo de ADN (10 copias/200 ng de ADN de entrada); los valores medios por debajo de LLOQ (es decir, no reportables, no cuantificables) se consideran aproximados. Se realizó una reacción de amplificación paralela para controlar la calidad del ADN analizado utilizando 12-20 ng de ADN genómico de entrada, una combinación cebador/sonda específica para la secuencia genómica no transcrita corriente arriba del gen CDKN1A (GENEBANK: Z85996) (cebador directo: GAAAGCTGACTGCCCTATTTG Id. de Sec. N°: 25, cebador reverso: GAGAGGAAGTGCTGGGAACAAT, Id. de Sec. N°: 26, sonda: VIC - CTC CCC AGT CTC TTT, Id. de Sec. N°: 27) y una curva patrón de 8 puntos creada por dilución de ADN genómico de control; estas reacciones de amplificación produjeron un factor de corrección (FC) (ng detectado/ng de entrada). Se calcularon copias transgén/microgramos de ADN de acuerdo con la fórmula: copias calculadas a partir de la curva estándar CD19/ADN de entrada (ng) x FC x 1000 ng. La exactitud de este ensayo se determinó por la capacidad de cuantificar el marcaje del producto celular infundido mediante Q-PCR de acuerdo con la fórmula: marcaje medio = copias detectadas/ADN de entrada x 6,3 pg ADN/célula somática masculina x FC frente a la positividad del transgén por citometría de flujo utilizando reactivos de detección específicos de CAR. Estas determinaciones ciegas generaron 22,68% de marcaje para el producto de infusión UPN 01 (22,6% por citometría de flujo), 32,33% para el producto de infusión UPN 02 (23% por citometría de flujo) y 4,3% para el producto de infusión UPN 03 (4,7% marcado por citometría de flujo).

40 Análisis de citoquinas

La cuantificación de factores de citoquinas solubles se llevó a cabo utilizando la tecnología Luminex bead array y los equipos adquiridos de las tecnologías Life (Invitrogen). Los ensayos se realizaron según el protocolo del fabricante con una curva estándar de 8 puntos generada usando una serie de dilución de 3 veces. Cada punto estándar y muestra se evaluaron por duplicado a una dilución de 1:3; el cálculo de % de CV para las medidas duplicadas fueron inferiores al 15%. Los datos se adquirieron en un Bioplex 200 y se analizaron con el programa Bioplex Manager versión 5.0 utilizando el análisis de regresión logística de 5 parámetros. Los intervalos de cuantificación de la curva estándar se determinaron por el intervalo de 80-120% (valor observado/esperado). Los intervalos individuales de cuantificación del analito se describen en las leyendas de las figuras.

50 Ensayo celular para detectar la función CAR

Las células se evaluaron para la funcionalidad después de descongelar y reposo durante la noche en TCM midiendo la desgranulación de CD107 en respuesta a las células diana. Los ensayos de desgranulación se realizaron usando 1×10^6 PBMC y $0,25 \times 10^6$ células diana en un volumen final de 500 μl en placas de 48 pocillos durante 2 horas a 37°C en presencia de CD49d (Becton Dickinson), anti-CD28, monensina (e-Bioscience) y anticuerpo CD107a-FITC (eBiosciences) esencialmente como se describe (Betts et al., 2003, J Immunol Methods 281:6578).

60 Reactivos de anticuerpos

Para estos estudios se usaron los siguientes anticuerpos: MDA-CAR, un anticuerpo murino anti CD 19 CAR conjugado con Alexa647 fue una donación generosa de los Dres. Bipulendu Jena y Laurence Cooper (MD Anderson Cancer Center). Para inmunofenotipificación multiparamétrica y ensayos funcionales: anti-CD3-A700, anti-CD8-PE-Cy7, anti-PD-1-FITC anti-CD25-AF488, anti-CD28-PercP-Cy5.5, anti-CD57-eF450, anti-CD27-APC-eF780, anti-CD17-APC-eF780, anti-CD45RAeF605NC, CD107a-FITC (todos de e-Bioscience), anti-CD4-

PE-Texas Red y Live/Dead Aqua (de Life Technologies) y anti-CD14-V500, anti-CD16-V500 (de Becton Dickinson). Para inmunofenotipificación general: CD3-PE, CD14-APC, CD14-PE-Cy7, CD16-FITC, CD16PE-Cy7, CD19-PE-Cy7, CD20-PE, todos de Becton Dickinson.

5 Citometría de flujo multiparamétrica

Las células se evaluaron por citometría de flujo frescas después del procesamiento de Ficoll-Paque o, si se congelaron, después de reposo durante la noche a una densidad de 2×10^6 células/ml en medio de linfocitos T (TCM) (X-vivo 15 (Lonza, 418Q) suplementado con 5% de suero AB humano (GemCall, 100-512), Hepes al 1% (Gibco, 15630-080), 1% Pen-Strep (Gibco, 15140-122), Glutamax al 1% (Gibco, 35050-061) y 0,2% de N-acetilcisteína (American Regent, NDC0517-7610-03) Se realizó inmunofenotipado multiparamétrico en 4×10^6 células totales /condición, usando tinción de FMO como se describe en el texto. Las células se tiñeron a una densidad de 1×10^6 células/100 μ l de PBS durante 30 minutos sobre hielo usando concentraciones de anticuerpo y reactivo recomendadas por el fabricante, lavadas, resuspendidas en paraformaldehído al 0,5% y adquiridas usando un LSRII modificado (sistemas de inmunocitometría BD) equipado con láser azul (488 nm) violeta (405 nm), verde (532) y rojo (633 nm) y conjuntos de filtros apropiados para la detección y separación de las combinaciones de anticuerpos anteriores. Un mínimo de 100.000 células CD3+ se adquirieron para cada tinción. Para los ensayos funcionales, las células se lavaron, se tiñeron para marcadores de superficie, se resuspendieron en paraformaldehído al 0,5% y se adquirieron como anteriormente; se recogieron un mínimo de 50.000 eventos CD3+ para cada condición de tinción. Los valores de compensación se establecieron usando tinciones de anticuerpos únicos y cuentas de compensación de BD (Becton Dickinson) y se calcularon y aplicaron automáticamente por el instrumento. Los datos se analizaron utilizando el programa FlowJo (Versión 8.8.4, Treestar). Para la inmunofenotipificación general se adquirieron células utilizando un citómetro Accuri C6 equipado con un láser azul (488) y rojo (633 nm). Los valores de compensación se establecieron usando tinciones de anticuerpos únicos y cuentas de compensación de BD (Becton Dickinson) y se calcularon manualmente. Los datos se analizaron utilizando el paquete de programa de análisis C-Flow (versión 1.0.264.9, citómetros de Accuri).

30 Historial médico previo del paciente y respuesta al tratamiento

Los resúmenes de tratamiento clínico se describen en la Figura 10. El paciente UPN 01 fue diagnosticado por primera vez con LLC de linfocitos B en estadio II a la edad de 55 años. El paciente estaba asintomático y se observó aproximadamente 1-1/2 años hasta requerir terapia para linfocitosis progresiva, trombocitopenia, adenopatía y esplenomegalia. Después de 4 ciclos de fludarabina, el paciente tenía una normalización completa del recuento sanguíneo y una respuesta completa mediante tomografías computarizadas. Se observó progresión con linfocitosis asintomática a los 5 meses, trombocitopenia y aumento de la adenopatía. El paciente fue observado sin síntomas durante aproximadamente 3 años, y más tarde requirió tratamiento con Rituximab y fludarabina para la leucocitosis progresiva, anemia y trombocitopenia. El paciente fue tratado con 4 ciclos de rituximab con fludarabina con mejoría parcial en el recuento sanguíneo. El paciente tuvo una progresión de nuevo en un año que requirió terapia manifestada por leucocitosis (WBC 150.000/ μ l) y trombocitopenia (plaquetas 30.000/ μ l) y se trató con alemtuzumab con normalización de los recuentos sanguíneos. Se observó progresión en 13 meses. El paciente recibió rituximab como agente único sin una respuesta significativa y seguido por rituximab, ciclofosfamida, vincristina y prednisona (R-CVP) durante 2 ciclos con una respuesta mínima y seguido de lenalidomida. Se suspendió la lenalidomida por toxicidad. El paciente recibió 2 ciclos de pentostatina, ciclofosfamida y rituximab con una respuesta mínima.

Posteriormente, el paciente recibió bendamustina como quimioterapia de linfoplastia 4 días antes de la infusión de células CART19. Antes de la terapia, el recuento de WBC era de 14.200/ μ l, la hemoglobina de 11,4 g/dl, el recuento de plaquetas de 78.000/ μ l y el ALC de 8000/ μ l. La tomografía computarizada mostró adenopatía difusa y la médula ósea se infiltró extensamente con LLC (67% de las células). El paciente recibió $1,6 \times 10^7$ células CART-19/kg ($1,13 \times 10^9$ células CART19 totales evaluadas por FACS). No hubo toxicidad por infusión. El paciente se hizo neutropénico aproximadamente 10 días después de la bendamustina y 6 días después de las infusiones de células CART19, y comenzando 10 días después de la primera infusión de CART19, el paciente desarrolló fiebre, rigidez e hipotensión transitoria. Al mismo tiempo, una radiografía de tórax y tomografía computarizada demostraron una neumonía del lóbulo superior izquierdo tratada con antibióticos. Las fiebres persistieron durante aproximadamente 2 semanas y se resolvieron cuando hubo recuperación de neutrófilos. El paciente no ha tenido más síntomas infecciosos o constitucionales.

El paciente obtuvo una respuesta rápida y completa como se representa en la Figura 5. Entre 1 y 6 meses después de la infusión no se han detectado células LLC circulantes en la sangre mediante citometría de flujo. La médula ósea a los 1, 3 y 6 meses después de las infusiones de células CART-19 muestra una ausencia sostenida del infiltrado linfocítico mediante la prueba de morfología y citometría de flujo. Las tomografías computarizadas a los 1 y 3 meses después de la infusión muestran una resolución completa de la adenopatía anormal. El paciente ha tenido leucopenia persistente (WBC 1000-3900/ μ l) y trombocitopenia (plaquetas ~

100.000/ μ l), e hipogammaglobulinia leve (IgG 525 mg/dL, normal 650-2000 mg/dL) pero sin complicaciones infecciosas.

5 El paciente UPN 02 se trató con células CART19 a los 77 años. El paciente tenía antecedentes relevantes de enfermedad coronaria y fue diagnosticado con LLC en 2000 a los 68 años cuando el paciente presentaba fatiga y leucocitosis. El paciente se mantuvo relativamente estable durante 4 años cuando el paciente desarrolló leucocitosis progresiva (195.000/ μ l), anemia y trombocitopenia que requirieron terapia. Las pruebas genéticas en ese momento mostraron que las células LLC tenían supresión del cromosoma 17p. Debido a la enfermedad progresiva, el paciente fue tratado con un ciclo de 12 semanas de alemtuzumab con una respuesta parcial y mejora en los recuentos sanguíneos. Al cabo de un año y medio el paciente tenía leucocitosis progresiva, anemia, trombocitopenia y esplenomegalia. El análisis cariotípico confirmó la delección del cromosoma 17p ahora con una delección del cromosoma 13q. El paciente se retrató con alemtuzumab durante 18 semanas con mejoría de la leucocitosis y estabilización de la anemia y esplenomegalia. El paciente tenía evidencia de leucocitosis progresiva, anemia y trombocitopenia en el plazo de un año. El tratamiento incluyó 2 ciclos de bendamustina con rituximab, resultando en una enfermedad estable, pero sin mejoría significativa como se muestra en la Figura 5A.

20 El paciente recibió bendamustina sola como quimioterapia de linfoplastia antes de la infusión de células CART-19. El paciente recibió $4,3 \times 10^6$ células CART 19/kg ($4,1 \times 10^8$ linfocitos totales) en 3 infusiones divididas complicadas por fiebres transitorias de hasta 102°F durante 24 horas. El día 11 después de la primera infusión, el paciente recibió un refuerzo de células CART19 de $4,1 \times 10^8$ ($4,3 \times 10^6$ /kg) y esta infusión se complicó por fiebre, rigidez y falta de aire sin hipoxia que requirió una hospitalización de 24 horas. No hubo evidencia de isquemia cardíaca, y los síntomas se resolvieron. El día 15 después de la primera infusión de CART-19 y el día 4 después de la infusión de células CART19 de refuerzo, el paciente fue admitido en el hospital con fiebres altas (hasta 104°F), escalofríos y rigidez. Pruebas extensas con cultivos de sangre y orina y CXR no identificaron una fuente de infección. El paciente se quejaba de falta de aliento, pero no tenía hipoxia. Un ecocardiograma mostró una hipoquinesia severa. La fracción de eyección fue del 20%. El paciente recibió prednisona 1 mg por kilogramo durante un día y 0,3 mg por kilogramo durante aproximadamente una semana. Esto resultó en la resolución rápida de la fiebre y la disfunción cardíaca.

30 Coincidente con el inicio de la fiebre alta, el paciente tuvo una caída rápida en linfocitos de sangre periférica como se representa en la Figura 5A. Aunque el paciente tenía normalización del recuento de glóbulos blancos, el paciente tenía LLC circulante persistente, anemia moderada estable y trombocitopenia. La médula ósea mostró infiltración extensa persistente de LLC un mes después del tratamiento a pesar de la citorreducción dramática de sangre periférica, y las tomografías computarizadas mostraron una reducción parcial de la adenopatía y la esplenomegalia. Cinco meses después de las infusiones de células CART19, el paciente desarrolló linfocitosis progresiva. Nueve meses después de las infusiones el paciente tenía linfocitosis (16.500/ μ l) con anemia moderada estable y trombocitopenia con adenopatía estable. El paciente permanece asintomático y no ha recibido tratamiento adicional.

40 El paciente UPN 03 fue diagnosticado con LLC de fase I asintomática a la edad de 50 y estuvo en observación durante 6 años. Posteriormente, el paciente tenía leucocitosis progresiva (recuento de glóbulos blancos 92.000/ μ l) y adenopatía progresiva que requería terapia. El paciente recibió 2 ciclos de rituximab con fludarabina que resultó en la normalización de los recuentos sanguíneos y mejoría significativa, aunque no completa resolución en la adenopatía. El paciente presentó aproximadamente un intervalo libre de progresión de 3 años seguido durante los siguientes 6 meses por leucocitosis rápidamente progresiva (WBC 165.000/ μ l) y adenopatía progresiva que requería terapia. El paciente recibió un ciclo de fludarabina y 3 ciclos de rituximab con fludarabina con normalización del recuento sanguíneo y resolución de la adenopatía palpable. El paciente presentó un intervalo libre de progresión de aproximadamente 20 meses hasta que el paciente volvió a desarrollar leucocitosis y adenopatía progresiva rápidamente. En ese momento, la médula ósea estaba extensamente infiltrada con LLC y el análisis cariotípico mostró que las células contenían la delección del cromosoma 17p con FISH que demostraba una delección de TP53 en 170/200 células. El paciente recibió un ciclo de rituximab con bendamustina seguido de 4 ciclos de **bendamustina** solamente (debido a una reacción alérgica severa al rituximab). El paciente tenía normalización inicial de los recuentos sanguíneos, pero poco después de la interrupción de la terapia había leucocitosis progresiva y adenopatía.

60 Los linfocitos T autólogos se recogieron mediante aféresis y se crioconservaron a partir del paciente UPN3. El paciente fue tratado con alemtuzumab durante 11 semanas con una excelente respuesta hematológica. Hubo mejoría, aunque no la resolución completa en la adenopatía. El paciente tenía una enfermedad activa pero estable durante los 6 meses siguientes. Posteriormente, el paciente recibió pentostatina y ciclofosfamida como quimioterapia de linfoplastia antes de la infusión de células CART19.

65 Tres días después de la quimioterapia, pero antes de la infusión celular, la médula ósea era hiper celular (60%) con aproximadamente un 40% de LLC. Debido a las limitaciones de fabricación inherentes a las recogidas de aféresis de pacientes con LLC como se muestra en la Tabla 3 y (Bonyhadi et al., 2005, J Immunol 174: 2366-

- 2375), el paciente fue infundido con un total de $1,46 \times 10^5$ células CART19+ por kg ($1,42 \times 10^7$ linfocitos totales CART19+) durante 3 días. No hubo toxicidad por infusión. Catorce días después de la primera infusión, el paciente comenzó a tener escalofríos, fiebres de hasta 102 °F, rigidez, náuseas y diarrea tratados sintomáticamente. El paciente no tenía síntomas respiratorios ni cardíacos. Al día 22 después de la infusión, se diagnosticó un síndrome de lisis tumoral manifestado por una LDH elevada, ácido úrico, y complicado por insuficiencia renal. El paciente fue hospitalizado y tratado con reanimación fluida y rasburicasa con rápida normalización del ácido úrico y la función renal. Se realizó una evaluación clínica detallada con CXR, sangre, orina y cultivos de heces y todos fueron negativos o normales.
- Al cabo de un mes de las infusiones de CART-19, el paciente tenía eliminación de la LLC circulante de la sangre y la médula ósea por morfología, citometría de flujo, citogenética y análisis FISH y las tomografías computarizadas mostraron resolución de adenopatía anormal (Figura 5C). La remisión del paciente se ha mantenido más allá de 8 meses desde la infusión de células CART19 inicial.
- Los resultados de los experimentos se describen a continuación.

Protocolo clínico

- Se incluyeron tres pacientes con LLC avanzada, resistente a la quimioterapia, en un ensayo clínico piloto como se muestra en la Figura 1. Todos los pacientes fueron extensamente pretratados con diversos regímenes de quimioterapia y biológicos como se muestra en la Figura 10. Dos de los pacientes tenían LLC deficiente en p53, una delección que presagia una respuesta deficiente a la terapia convencional y una progresión rápida (Dohner et al., 1995, Blood, 851580-1589). Cada uno de los pacientes tenía cargas tumorales grandes después de la quimioterapia preparativa, incluyendo infiltración extensa de la médula (40 a 95%) y linfadenopatía; el paciente UPN 02 también tuvo linfocitosis periférica significativa. Los linfocitos T CART19 se prepararon como se representa en la Figura 1B y se muestran detalles de la fabricación de células y caracterización del producto para cada paciente en la Tabla 4. Todos los pacientes fueron pretratados 1-4 días antes de las infusiones de linfocitos T CART19 con quimioterapia de eliminación de linfoma. Se utilizó un programa de infusión de células de dosis dividida debido a que el ensayo probaba un CAR que incorporaba un dominio de señalización coestimulador 4-1BB como se representa en la Figura 1A.

Tabla 4: Productos de aféresis y criterios de liberación del producto CART19

Producto de aféresis	Ensayo	Especificación	UPN 01	UPN 02	UPN 03
	Citometría de flujo para CD3+ de CD45+	N/A	4,46%	2,29%	2,67%
Producto CART19					
	Número total de células Infundido	$\sim 2,5 \times 10^9$	5×10^9	$1,275 \times 10^9$ $1,275 \times 10^9$ [2,55 x 10 ⁹ total]	3×10^8
	Viabilidad celular	$\geq 70\%$	96,2%	95,3 (90,5) ¹	90,3%
	Células CD3+	$> 80\%$	88,9%	98,8	98,9
	Nº Cuentas residuales	≤ 100 cuentas / 3×10^6 células	3,95	1	4
	Endotoxina	$\leq 3,5$ EU/mL	$< 0,5$ EU/mL	$< 0,5$ EU/mL	
	Micoplasma	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Esterilidad (Bactec)	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
	Cultivo de hongos	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
	ELISA BSA	≤ 1 µg/ml	$< 0,5$ ng/mL	$< 0,5$ ng/mL	$< 0,5$ ng/mL
	Replicación Lentivirus Competente (RCL)	RCL No Detectable	No Detectable	No concluyente ² No concluyente ²	
	Eficiencia de transducción (expresión scFv)	$\geq 20\%$	22,6%	23%	4,74% ⁴
	Secuencia de ADN del vector (PCR CART19)	0,2-3 copias/célula	0,15 ³	0,275	0,101

1 = Dosis nº 2.
 2 = valor de ensayo en el día 12 por debajo de LOQ y había disminuido a partir de la expansión anterior consistente con la transferencia del ADN plasmídico a partir de la generación del vector. Presentado a la FDA como una enmienda informativa.
 3 = Liberación del producto basada en la tinción superficial por FACS.
 4 = Excepción de tratamiento otorgada por los criterios de liberación por DSMC externo e IRB.

Expansión in vivo y persistencia de CART19 y tráfico a médula ósea

Se cree que los linfocitos T CAR+ expandidos usando cuentas de CD3/CD28 y que expresan un dominio de señalización de 4-1BB están en mejoras para CAR carentes de 4-1BB. Se desarrolló un ensayo de Q-PCR para permitir el seguimiento cuantitativo de células CART 19 en sangre y médula ósea. Todos los pacientes tuvieron expansión y persistencia de las células CART19 en sangre durante al menos 6 meses como se muestra en las Figuras 2A y 2C. En particular, los pacientes UPN 01 y UPN 03 tuvieron una expansión de 1.000 a 10.000 veces de células T CAR+ en sangre durante el primer mes después de la infusión. Los niveles máximos de expansión coincidieron con el inicio de los síntomas clínicos postinfusión en el paciente UPN 01 (día 15) y paciente UPN 03 (día 23). Además, tras un decaimiento inicial que puede modelarse con cinética de primer orden, los niveles de linfocitos T CART19 se estabilizaron en los 3 pacientes desde el día 90 hasta 180 después de la infusión. Significativamente, los linfocitos T CART19 también migraron a la médula ósea en todos los pacientes, aunque a niveles 5 a 10 veces menores que los observados en la sangre como se representa en las Figuras 2D a 2F. Los pacientes UPN 01 y 03 tuvieron una disminución lineal logarítmica en la médula, con una desaparición T1/2 de ~35 días.

Inducción de respuestas inmunitarias específicas en los compartimientos de sangre y médula ósea tras la infusión de CART19

Se recogieron muestras de suero de todos los pacientes y se analizaron por lotes para determinar cuantitativamente los niveles de citoquinas, evaluando un panel de citoquinas, quimioquinas y otros factores solubles para evaluar las toxicidades potenciales y proporcionar evidencia de la función celular CART19 tal como se muestra en la Figura 3. De treinta analitos probados, once tuvieron un cambio de 3 veces o más desde la línea basal, incluyendo 4 citoquinas (IL-6, INF- γ , IL-8 e IL-10), 5 quimioquinas (MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, CXCL9, CXCL10) y receptores solubles para IL-1R α e IL-2R α . De estos, el interferón- γ tuvo el mayor cambio relativo desde la línea de base. Curiosamente, el tiempo máximo de elevación de citoquinas en UPN 01 y UPN 03 se correlacionó temporalmente con los síntomas clínicos previamente descritos y los niveles máximos de células CART19 en la sangre en cada paciente. Sólo se observaron cambios modestos en el paciente UPN 02, tal vez como resultado del tratamiento con corticosteroides administrado a este paciente. No se detectó elevación de la IL-2 soluble en el suero de los pacientes, aunque una de las razones preclínicas para desarrollar linfocitos T CAR+ con dominios de señalización 4-1BB era la propensión reducida a desencadenar la secreción de IL-2 comparada con la señalización de CD28 (Milone et al., 2009, Mol Ther. 17: 1453 - 1464). Esto puede ser relevante para la actividad clínica sostenida ya que estudios previos han demostrado que los linfocitos T CAR+ están potencialmente suprimidos por los linfocitos T reguladores (Lee y col., 2011, Cancer Res 71: 2871-2881), células que podrían ser provocadas por CAR que secretan cantidades sustanciales de IL-2 o por la provisión de IL-2 exógena después de la infusión. Finalmente, se observó una inducción robusta de la secreción de citoquinas en los sobrenadantes de los aspirados de médula ósea de UPN 03 como se representa en la Figura 3D que también coincidió con el desarrollo del síndrome de lisis tumoral y remisión completa.

Expresión prolongada y establecimiento de una población de células CART19 de memoria en sangre

Una cuestión central en la inmunoterapia del cáncer mediada por CAR es si los dominios optimizados de fabricación celular y de coestimulación aumentan la persistencia de linfocitos T modificados genéticamente y permiten el establecimiento de linfocitos T de memoria CAR+ en pacientes. Los estudios previos no han demostrado una expansión robusta, prolongada persistencia y/o expresión de CAR en linfocitos T después de la infusión (Kershaw et al., 2006, Clin Cancer Res 12: 6106-6115, Lamers et al., 2006, J Clin Oncol 24: e20- e22, Till et al., 2008, Blood, 112, 2261-2271, Savoldo et al., 2011, J Clin Invest doi: 10.1172/JCI146110). El análisis fluidocitométrico de muestras de sangre y médula a los 169 días después de la infusión reveló la presencia de células que expresan CART19 en UPN 03 (Figuras 4A y 4B) y una ausencia de linfocitos B como se representa en la Figura 4A. De forma notable, mediante el ensayo QPCR, los tres pacientes presentaron células CAR+ persistentes a los 4 meses y más allá como se representa en las figuras 2 y 6. La frecuencia in vivo de células CAR+ por citometría de flujo coincide estrechamente con los valores obtenidos del ensayo de PCR para el transgén CART19. De forma importante, en el paciente UPN 03, sólo las células CD3+ expresaron el CART19, ya que no se detectaron células CAR19+ en subconjuntos CD16 o CD14-positivo como se muestra en la Figura 4A. También se detectó la expresión de CAR en la superficie del 4,2% de los linfocitos T en la sangre del paciente UPN 01 en el día 71 después de la infusión, como se muestra en la Figura 7.

A continuación, se utilizó citometría de flujo policromática para llevar a cabo estudios detallados para caracterizar adicionalmente la expresión, el fenotipo y la función de células CART19 en UPN 03 usando un anticuerpo de idiotipo anti-RAC (MDA-647) y una estrategia de bloqueo mostrada en la Figura 8. Se observaron diferencias notables en la expresión de marcadores de activación y memoria tanto en células CD8+ como CD4+ basadas en la expresión de CART19. Al día 56, las células CART 19 CD8+ mostraron principalmente un fenotipo de memoria efector (CCR7-CD27-CD28-) consistente con una exposición prolongada y robusta al antígeno como se representa en la Figura 4C. Por el contrario, las células CD8+ CAR-negativas constaban de mezclas de células efectoras y de memoria central, con expresión de CCR7 en un subconjunto de células, y cantidades sustanciales en las fracciones CD27+/CD28- y CD27+/CD28+.

y CAR-negativas expresaban expresamente CD57, esta molécula fue coexpresada uniformemente con PD-1 en las células CART19, un posible reflejo de la extensa historia replicativa de estas células. En contraste con la población de células CAR-negativas, la totalidad de la población CART19 CD8+ carecía de expresión de CD25 y CD127. En el día 169, mientras que el fenotipo de la población celular CAR-negativa permaneció similar a la muestra del día 56, la población CART19 había evolucionado para contener una población minoritaria con características de células centrales de memoria, en particular la expresión de CCR7, niveles más altos de CD27 y CD28, así como las células CAR+ que eran PD-1-negativas, CD57-negativas y CD 127-positivas.

En el compartimiento CD4+, al día 56, las células CART 19 se caracterizaron por una falta uniforme de CCR7 y un predominio de células CD27+/CD28+/PD-1+ distribuidas dentro de ambos compartimentos CD57+ y CD57-, y una ausencia esencial de expresión de CD25 y CD127 tal como se representa en la figura 4B. En contraste, las células CAR- negativas en este punto de tiempo fueron heterogéneas en la expresión de CCR7, CD27 y PD-1, expresaron CD127 y también contenían una población CD25 +/CD127- (población potencialmente reguladora de linfocitos T). Al día 169, mientras que la expresión de CD28 permaneció uniformemente positiva en todas las células CAR+ CD4+, una fracción de las células CD4+ de CART19 había evolucionado hacia un fenotipo de memoria central con expresión de CCR7, un mayor porcentaje de células CD27, la aparición de un subgrupo PD-1 negativo, y la adquisición de la expresión de CD127. Las células CAR-negativas permanecieron razonablemente consistentes con sus homólogos del día 56, con la excepción de una reducción en la expresión de CD27 y una disminución en el porcentaje de células CD25 +/CD127.

Las células CART19 pueden retener la función efectora después de 6 meses en sangre

Además de la corta persistencia y la proliferación in vivo inadecuada, una limitación de los ensayos previos con linfocitos T CAR+ ha sido la rápida pérdida de actividad funcional de los linfocitos T infundidos in vivo. El alto nivel de persistencia de células CART19 y la expresión superficial de la molécula CAR19 en pacientes UPN 01 y 03 proporcionaron la oportunidad de comprobar directamente las funciones efectoras específicas de anticuerpos anti-CD 19 en células recuperadas de muestras de sangre periférica crioconservadas. Las PBMC del paciente UPN 03 se cultivaron con células diana que eran positivas o negativas para la expresión de CD 19 (Figura 4d). La robusta función efectora específica de CD19 de los linfocitos T CART19 fue demostrada por desgranulación específica contra células diana CD19-positivas pero no contra CD19-negativas, según se evaluó mediante la expresión de superficie de CD107a. Notablemente, la exposición de la población CART19 a dianas CD19 positivas indujo una rápida internalización de CAR-19 de superficie como se muestra en la Figura 8 para la expresión superficial de CAR 19 en las mismas células efectoras en la tinción citométrica de flujo estándar. La presencia de moléculas coestimuladoras en las células diana no fue necesaria para desencadenar la desgranulación celular de CART19 porque la línea NALM-6 no expresa CD80 o CD86 (Brentjens et al., 2007, Clin Cancer Res 13: 5426-5435). La función efectora fue evidente al día 56 después de la infusión y se mantuvo al día 169. La robusta función efectora de las células CAR+ y CAR-T también pudo demostrarse mediante estimulación farmacológica.

Actividad clínica de las células CART19

No se observaron toxicidades significativas durante los cuatro días siguientes a la infusión en ningún paciente, excepto las reacciones febriles transitorias. Sin embargo, todos los pacientes desarrollaron posteriormente toxicidades clínicas y de laboratorio significativas entre el día 7 y el 21 después de la primera infusión. Estas toxicidades fueron a corto plazo y reversibles. De los tres pacientes tratados hasta la fecha, hay 2 CR y 1 PR a > 6 meses después de la infusión de CART19 según criterios estándar (Hallek et al., 2008, Blood 111: 5446). Los detalles de la historia clínica y la respuesta al tratamiento para cada paciente se muestran en la Figura 10.

En resumen, el paciente UPN 01 desarrolló un síndrome febril, con rigidez e hipotensión transitoria a partir del día 10 después de la infusión. Las fiebres persistieron durante aproximadamente 2 semanas y se resolvieron; el paciente no ha tenido más síntomas constitucionales. El paciente logró una respuesta rápida y completa como se muestra en la Figura 5. Entre 1 y 6 meses después de la infusión, no se han detectado células LLC circulantes en la sangre mediante citometría de flujo. La médula ósea a los 1, 3 y 6 meses después de las infusiones de células CART19 muestra ausencia sostenida del infiltrado linfocítico por morfología y análisis de citometría de flujo como se representa en la Figura 5B. Las tomografías computarizadas a los 1 y 3 meses después de la infusión muestran la resolución de la adenopatía como se muestra en la Figura 5C. La remisión completa se mantuvo durante 10 meses o más al momento de este informe.

El paciente UPN 02 se trató con 2 ciclos de bendamustina con rituximab, dando como resultado una enfermedad estable como se representa en la Figura 5A. El paciente recibió una tercera dosis de bendamustina como quimioterapia de linfoplastia antes de la infusión de linfocitos T CART19. El paciente desarrolló fiebre a 40 ° C, rigidez y disnea, requiriendo una hospitalización de 24 horas al día 11 después de la primera infusión y el día de la segunda infusión de células CART19. Las fiebres y los síntomas constitucionales persistieron y el día 15, el paciente tenía disfunción cardíaca transitoria; todos los síntomas se resolvieron después de que se inició el tratamiento con corticosteroides el día 18. Después de la infusión de CART 19 y coincidiendo con el inicio de fiebres altas, el paciente tenía un aclaramiento rápido de las células LLC deficientes en p53 de la sangre

periférica como se representa en la Figura 5A y una reducción parcial de la adenopatía, la médula ósea mostró una infiltración extensa persistente de LLC un mes después del tratamiento a pesar de la citorreducción dramática de sangre periférica. El paciente permanece asintomático.

5 El paciente UPN 03 recibió pentostatina y ciclofosfamida como quimioterapia de linfoplastia antes de la infusión de células CART19. Tres días después de la quimioterapia, pero antes de la infusión celular, la médula ósea fue hiperplásica (60%) con aproximadamente 50% de LLC. El paciente recibió una dosis baja de células CART19 (1,5x10⁵ linfocitos T CAR+/kg divididas en 3 días). De nuevo, no hubo toxicidad aguda por infusión. Sin embargo, 14 días después de la primera infusión, el paciente comenzó a tener rigidez, fiebres, náuseas y diarrea. Al día 22 después de la infusión, el síndrome de lisis tumoral se diagnosticó requiriendo hospitalización. El paciente tenía la resolución de síntomas constitucionales, y después de un mes de las infusiones de CART19, el paciente tenía la eliminación de LLC circulante de la sangre y de médula ósea por morfología, citometría de flujo, citogenética y análisis FISH. Las tomografías computarizadas mostraron una resolución de adenopatía anormal como se representa en las figuras 5B y 5C. La remisión completa se mantuvo más allá de 8 meses desde la infusión de células CART19 inicial.

Consideraciones de la proporción in vivo de CART19 efectora respecto a células LLC diana

20 Los estudios preclínicos mostraron que los tumores grandes podían ser ablacionados y que la infusión de 2,2x10⁷ CAR podría erradicar tumores compuestos de 1x10⁹ células, para una relación E:T in vivo de 1:42 en ratones humanizados (Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106: 3360 - 3365), aunque estos cálculos no tuvieron en cuenta la expansión de los linfocitos T después de la inyección. La estimación de la carga tumoral de LLC a lo largo del tiempo permitió el cálculo de la reducción tumoral y las relaciones estimadas de CART19 E:T alcanzadas in vivo en los tres sujetos basándose en el número de células CAR+ infundidas. Las cargas tumorales se calcularon midiendo la carga de LLC en médula ósea, sangre y tejidos linfoides secundarios. Las cargas tumorales basales como se muestra en la Figura 10 indican que cada paciente tenía del orden de 10¹² células LLC (es decir, 1 kilogramo de carga tumoral) antes de la infusión de CART19. El paciente UPN 03 tenía una carga tumoral basal estimada de 8,8x10¹¹ células LLC en la médula ósea en el día -1 (es decir, después de la quimioterapia y previo a la infusión de CART19), y una masa tumoral medida en los tejidos linfoides secundarios de células de 3,3-5.5x10¹¹ LLC dependiendo del método de análisis de tomografía computarizada volumétrica. Dado que UPN 03 se infundió con sólo 1,4x10⁷ células CART19, utilizando la estimación de la carga tumoral total inicial (1,3x10¹² células LLC), y que no se detectaron células LLC después del tratamiento, se logró una sorprendente relación E:T de 1:93.000. Mediante cálculos similares, se calculó una relación efectiva E:T in vivo de 1:2200 y 1:1000 para UPN 01 y UPN 02 (como se muestra en la Tabla 3). Al final, una contribución de la matanza en serie por linfocitos T CART19, combinada con una expansión in vivo CART19 de > 1.000 veces probablemente contribuyó a los poderosos efectos antileucémicos mediados por células CART19.

40 Linfocitos T que expresan receptores quiméricos establecen memoria y potentes efectos antitumorales en pacientes con leucemia avanzada

45 La limitada expresión in vivo y la función efectora de los CAR ha sido una limitación central en los ensayos que analizaron los CAR de primera generación (Kershaw et al., 2006, Clin Cancer Res 12:6106-6115; Lamers et al., 2006, J Clin Oncol 24:e20-e22; Till et al., 2008, Blood, 112, 2261-2271; Park et al., 2007, Mol Ther 15:825833; Pule et al., 2008, Nat Med 14:1264-1270). Basado en un modelo preclínico que demuestra una persistencia mejorada de CAR que contienen un módulo de señalización 4-1BB (Milone et al., 2009, Mol Ther. 17: 1453 - 1464, Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106: 3360-3365), se diseñaron experimentos para desarrollar una segunda generación de CAR diseñada con tecnología vectorial lentiviral. Se encontró que esta segunda generación de CAR era segura en el contexto de la infección crónica por VIH (Levine et al., 2006, Proc Natl Acad Sci USA 103: 17372-17377). Los presentes resultados muestran que cuando esta segunda generación de CAR se expresó en linfocitos T y se cultivó en condiciones diseñadas para promover el injerto de linfocitos T de memoria central (Rapoport et al., 2005, Nat Med 11: 1230-1237, Bondanza et al., 2006, Blood 107: 1828-1836), se observó una expansión mejorada de los linfocitos T CAR después de la infusión en comparación con los informes anteriores. Las células CART 19 establecieron la memoria celular específica de CD19 y mataron células tumorales en relaciones E:T in vivo no alcanzadas previamente.

60 CART 19 es el primer ensayo de CAR que incorpora un dominio de señalización 4-1BB y el primero en utilizar la tecnología de vector lentiviral. Los presentes resultados demuestran el seguimiento eficiente de CAR a sitios tumorales, con el establecimiento de facto de "linfocitos infiltrantes de tumores" que presentaron especificidad de CD19. La pronunciada expansión in vivo permitió la primera demostración de que los CAR recuperados directamente de los pacientes pueden retener la función efectora in vivo durante meses. Un estudio previo sugirió que la introducción de una primera generación de CAR en linfocitos T específicos de virus es preferible a los linfocitos T primarios (Pule et al., 2008, Nat Med 14: 1264-1270), sin embargo, los resultados con CAR de segunda generación introducidos de manera óptima en los linfocitos T primarios coestimulados cuestionan esta noción. Sin pretender limitarse a ninguna teoría en particular, se hace una advertencia de que los efectos clínicos fueron profundos y sin precedentes con la lisis de cargas tumorales del tamaño de un kilogramo en los

tres pacientes acompañadas con la liberación retardada de niveles potencialmente peligrosos de citoquinas en dos de los pacientes. No se observaron efectos clásicos de las tormentas de citoquinas. Sin embargo, el presente estudio fue diseñado para mitigar esta posibilidad por infusión deliberada de CART19 durante un período de tres días.

Se encontró que dosis muy bajas de CAR pueden provocar respuestas clínicas potentes. Este fue un estudio piloto que demostró la seguridad del diseño del vector CART19. La observación de que las dosis de células CART19 de varios órdenes de magnitud por debajo de las ensayadas en ensayos previos pueden tener beneficios clínicos pueden tener implicaciones importantes para la futura implementación de la terapia CAR en una escala más amplia y para el diseño de ensayos que prueban CAR dirigidos contra dianas distintas de CD19.

Los presentes estudios indican además que CART19 se expresa tanto en linfocitos T de memoria central como en linfocitos T efectores, lo que probablemente contribuye a su supervivencia a largo plazo en comparación con los informes anteriores. Sin desear estar limitados por ninguna teoría en particular, los linfocitos T CAR pueden diferenciarse in vivo en un estado similar a linfocitos de memoria central al encontrarse y eliminar posteriormente las células diana (por ejemplo, células tumorales LLC o linfocitos B normales) que expresan el sustituto de antígeno. De hecho, se ha informado que la señalización de 4-1BB promueve el desarrollo de memoria en el contexto de la señalización de TCR (Sabbagh et al., 2007, Trends Immunol 28: 333 - 339).

La prolongación de la proliferación y supervivencia de CART19 ha revelado aspectos de la farmacocinética de linfocitos T CAR que no se han descrito previamente. Se observó que la cinética de liberación de citoquinas en el suero y la médula se correlacionó con los niveles máximos de CART19, de manera que es posible que la desintegración se inicie cuando las dianas celulares que expresan CD19 se vuelven limitantes. El mecanismo de la supervivencia prolongada de CART19 puede estar relacionado con la incorporación anteriormente mencionada del dominio 4-1BB o con la señalización a través del TCR natural y/o CAR. Una posibilidad intrigante es que la supervivencia extendida está relacionada con la población de CART19 que se ha identificado en los especímenes de médula ósea, planteando la hipótesis de que CD19 CAR podría mantenerse por encuentro con progenitores de linfocitos B en la médula ósea. Relacionado con esta pregunta ¿qué es lo que impulsa la expansión inicial de células CART 19 in vivo? Con raras excepciones (Savoldo et al., 2011, J Clin Invest doi: 10.1172/JCI46110, Pule et al., 2008, Nat Med 14: 1264-1270), el presente estudio es el único ensayo que ha omitido las infusiones de IL-2, de manera que las células CART19 probablemente se expandieron en respuesta a citoquinas homeostáticas o más probablemente a CD19 expresadas en dianas leucémicas y/o linfocitos B normales. En este último caso, esto podría ser una característica atractiva para CAR dirigidos contra APC normales o diana tales como CD19 y CD20, ya que es posible que la auto-renovación de CART19 ocurra en las células normales, proporcionando un mecanismo para la memoria CAR por medio de "auto-vacunación/estimulación" y por lo tanto, inmunovigilancia tumoral a largo plazo. Los mecanismos de la homeostasis de CART19 pueden requerir un estudio adicional para elucidar los mecanismos intrínsecos y extrínsecos de persistencia. Antes de estos resultados, la mayoría de los investigadores han visto la terapia CAR como una forma transitoria de la inmunoterapia, sin embargo, CAR con dominios de señalización optimizados pueden tener un papel tanto en la inducción de la remisión y la consolidación, así como para la inmunodeficiencia a largo plazo.

Se han observado potentes efectos antileucémicos en los tres pacientes, incluyendo dos pacientes con leucemia deficiente en p53, estudios previos con CAR han tenido dificultad para separar los efectos antitumorales de la quimioterapia de eliminación de linfoma. Sin embargo, la liberación retardada de citoquinas combinada con la cinética de lisis tumoral en pacientes refractarios a fludarabina fue coincidente y posiblemente dependiente de la expansión CAR in vivo en el presente estudio, indica que CART19 media efectos antitumorales potentes. Los resultados actuales no excluyen un papel de la quimioterapia en la potenciación de los efectos del CAR.

Puede ser necesaria una comparación completa de los procedimientos de fabricación de vectores, transgenes y células con los resultados de estudios en curso en otros centros para obtener una comprensión completa de las características clave requeridas para obtener una función sostenida de linfocitos T CAR in vivo. A diferencia de las terapias con anticuerpos, los linfocitos T CAR modificados tienen el potencial de replicarse in vivo, y la persistencia a largo plazo podría conducir a un control sostenido del tumor. La disponibilidad de una terapia fuera de la plataforma compuesta de linfocitos T asesinos no resistentes tiene el potencial de mejorar el resultado de pacientes con neoplasias malignas de linfocitos B. Una limitación de la terapia con anticuerpos, como, por ejemplo, con agentes tales como rituximab y bevizumab, es que la terapia requiere infusiones repetidas de anticuerpos, que es inconveniente y costoso. El suministro de terapia prolongada de anticuerpos (en este caso durante al menos 6 meses en 3 de 3 pacientes tratados hasta la fecha) con scFv anti-CD19 expresado en linfocitos T después de una sola infusión de células CART19 tiene una serie de ventajas prácticas, incluyendo conveniencias y ahorro de costes.

Ejemplo 2: Linfocitos T modificados en el receptor de antígeno quimérico en la leucemia linfocítica crónica

Se diseñó un vector lentiviral que expresa un receptor de antígeno quimérico con especificidad para el antígeno de linfocitos B CD19, acoplado con CD137 (un receptor coestimulador en linfocitos T [4-1BB]) y CD3-zeta (un componente de transducción de señal del receptor de antígeno de linfocitos T). Se observó que una dosis baja (aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células por kilogramo de peso corporal) de linfocitos T modificados con receptor de antígeno quimérico autólogo, reinfundidos en un paciente con leucemia linfocítica crónica refractaria (LLC), se expandió a un nivel que era más de 1000 veces más alto que el nivel inicial de injerto in vivo. También se observó que el paciente presentaba un desarrollo tardío del síndrome de lisis tumoral y con remisión completa.

Aparte del síndrome de lisis tumoral, el único otro efecto tóxico de grado 3/4 relacionado con los linfocitos T de receptor de antígeno quimérico fue linfopenia. Las células manipuladas persistieron en niveles altos durante al menos 6 meses en la sangre y la médula ósea y continuaron expresando el receptor de antígeno quimérico. Se detectó una respuesta inmune específica en la médula ósea, acompañada por pérdida de linfocitos B normales y células de leucemia que expresan CD19. La remisión estuvo en curso 10 meses después del tratamiento. La hipogammaglobulinemia fue un efecto tóxico crónico esperado.

Los materiales y métodos empleados en estos experimentos se describen ahora.

Materiales y Métodos

Procedimientos del estudio

Se diseñó un vector lentiviral autoinactivante (GeMCRIS 0607-793), que se sometió a pruebas de seguridad preclínicas, como se informó anteriormente (Milone et al., 2009, *Mol Ther*, 17: 1453-64). Los métodos de preparación de linfocitos T también se han descrito anteriormente (Porter et al., 2006, *Blood*, 107: 1325 - 31). Se realizó un análisis cuantitativo por reacción en cadena de polimerasa (PCR) para detectar linfocitos T con receptores de antígeno quimérico en sangre y médula ósea. El límite inferior de cuantificación se determinó a partir de la curva estándar; los valores medios por debajo del límite inferior de cuantificación (es decir, notificables pero no cuantificables) se consideran aproximados. El límite inferior de la cuantificación del ensayo fue de 25 copias por microgramo de ADN genómico.

Se realizó un análisis de factor soluble con el uso de suero de sangre entera y médula ósea que se separó en alícuotas para un solo uso y se almacenó a -80°C . La cuantificación de factores de citoquinas solubles se realizó con el uso de la tecnología Luminex bead-array y reactivos (Life Technologies).

Aferesis nº 1

Se lleva a cabo un procedimiento de aféresis de 12-15 litros en el centro de aféresis. Se obtienen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para la generación de linfocitos T CART-19 durante este procedimiento. De una única leucaféresis, se recogen al menos 50×10^9 glóbulos blancos para fabricar linfocitos T CART-19. También se obtienen leucocitos basales de sangre y crioconservación.

Quimioterapia citorreductora

La quimioterapia se inicia aproximadamente entre 5 y 10 días antes de la infusión, de modo que las células CART-19 se pueden administrar 1-2 días después de la finalización de la quimioterapia. El momento de la iniciación de la quimioterapia, por lo tanto, depende de la duración del régimen. El propósito de la quimioterapia es inducir linfopenia con el fin de facilitar el injerto y la expansión homeostática de células CART-19. La quimioterapia puede elegirse también para reducir la carga tumoral de la enfermedad. La quimioterapia citorreductora es elegida y administrada por oncólogos de la comunidad. La elección de la quimioterapia depende de la enfermedad subyacente y de las terapias anteriores. La fludarabina ($30 \text{ mg/m}^2/\text{día} \times 3 \text{ días}$) y la ciclofosfamida ($300 \text{ mg/m}^2/\text{día} \times 3 \text{ días}$) son los agentes de elección, ya que existe la mayor experiencia con el uso de estos agentes para facilitar la inmunoterapia adoptiva. También son apropiados otros regímenes diferentes que utilizan fármacos aprobados por la FDA, incluyendo CHOP, HyperCVAD, EPOCH, DHAP, ICE u otros regímenes.

Valoración de reestadificación

Se realiza una reestadificación limitada al completar la quimioterapia con el fin de proporcionar mediciones basales de la carga tumoral. Esto incluye análisis de pruebas de imagen, examen físico y enfermedad residual mínima (MRD). Los sujetos se someten a las siguientes pruebas de preinfusión: examen físico, documentación de eventos adversos y extracciones de sangre para hematología, química y pruebas de embarazo (si corresponde).

Preparación de linfocitos T CART-19

Los linfocitos T autólogo se manipulan para expresar un anticuerpo de cadena única extracelular (scFv) con especificidad para CD19. El scFv extracelular puede redirigir la especificidad de los linfocitos T transducidos hacia células que expresan CD19, una molécula que está restringida en la expresión en la superficie de las células malignas y en los linfocitos B normales. Además de CD19 scFv, las células son transducidas para expresar una molécula de señalización intracelular compuesta por la cadena TCR ζ o un dominio de señalización en tándem compuesto por módulos de señalización 4-1BB y TCR ζ . El scFv se deriva de un anticuerpo monoclonal de ratón, y por lo tanto contiene secuencias de ratón, y los dominios de señalización son enteramente de las secuencias humanas nativas. Los linfocitos T CART-19 se fabrican aislando los linfocitos T por aféresis y utilizando tecnología de vector lentiviral (Dropulic et al., 2006, Human Gene Therapy, 17: 577-88, Naldini et al., 1996, Science, 272: 263 Dull et al., 1998, J. Virol, 72: 8463-71) para introducir el scFv:TCR ζ : 4-1BB en linfocitos T CD4 y CD8. En algunos pacientes, se introduce un scFv:TCR ζ de control en una porción de las células para un experimento de repoblación competitivo. Estos receptores son "universales" en el sentido de que se unen al antígeno de una manera independiente del MHC, por lo que se puede usar una construcción de receptor para tratar una población de pacientes con tumores positivos al antígeno CD19.

Las construcciones de CAR se desarrollaron en la Universidad de Pensilvania, y el vector de grado clínico se fabricó en Lentigen Corporation. Las células CART-19 se fabrican en la Unidad de producción de células clínicas y vacunas de la Universidad de Pensilvania de acuerdo con el proceso mostrado en la Figura 11. Al final de los cultivos celulares, las células son criopreservadas en criomedios infundibles. Se administra una sola dosis de linfocitos T transducidos con CART-19 que comprende la infusión de $2,5 \times 10^9$ a 5×10^9 células totales, en 1 ó 2 bolsas. Cada bolsa contiene una alícuota (volumen dependiente de la dosis) de criomedio que contiene los siguientes reactivos de grado infundible (% v/v): 31,25 plasmalyte-A, 31,25 dextrosa (5%), 0,45 NaCl, hasta 7,50 DMSO, 1,00 dextranso-40, 5,00 albúmina de suero humano con aproximadamente $2,5-5 \times 10^9$ linfocitos T autólogos por bolsa. Para mayor seguridad, la primera dosis se administra como una dosis fraccionada en los días 0,1 y 2, con ~ 10% de las células el día 0, 30% el día 1 y 60% el día 2.

Almacenamiento

Se almacenan bolsas (capacidad de 10 a 100 ml) que contienen linfocitos T transducidos con CART-19 en condiciones de banco de sangre en un congelador controlado a -135°C . Las bolsas de infusión se almacenan en el congelador hasta que sea necesario.

Descongelación celular

Después de registrar las células en la farmacia de investigación, las células congeladas se transportan en hielo seco hasta la cama del paciente. Las células se descongelan en la cama, una bolsa cada vez usando un baño de agua mantenido entre 36°C y 38°C . La bolsa se masajea suavemente hasta que las células se han descongelado. No debe haber masas congeladas en el recipiente. Si el producto de células CART-19 parece tener una bolsa dañada o con fugas, o parece estar comprometida de alguna otra forma, no debe infundirse.

Premedicación

Los efectos secundarios después de infusiones de linfocitos T pueden incluir fiebre transitoria, escalofríos y/o náuseas. Se recomienda que el sujeto sea premedicado con paracetamol 650 mg por vía oral e hidrocóloruro de difenhidramina 25-50 mg por vía oral o IV, antes de la infusión de células CART-19. Estos medicamentos pueden repetirse cada seis horas según sea necesario. Un curso de medicación antiinflamatoria no esteroide puede ser prescrito si el paciente continúa teniendo fiebre no aliviada por el acetaminofeno. Se recomienda que los pacientes no reciban corticoides sistémicos como la hidrocortisona, la prednisona, la prednisolona (Solu-Medrol) o la dexametasona (Decadron) en ningún momento, excepto en el caso de una emergencia potencialmente mortal, ya que esto puede tener un efecto adverso sobre los linfocitos T. Si se requieren corticosteroides para una reacción aguda de infusión, se recomienda una dosis inicial de 100 mg de hidrocortisona.

Administración/infusión

Las infusiones comienzan 1 a 2 días después de la finalización de la quimioterapia. El día de las primeras infusiones, los pacientes tienen un CBC con diferencial, y la evaluación de los recuentos de CD3, CD4 y CD8, desde la quimioterapia se administra en parte para inducir linfopenia, sin pretender estar vinculado por ninguna teoría en particular, se cree que una dosis inicial i.v. de $2,5 \times 10^9$ linfocitos CART-19 es óptimo para el protocolo, debido a que existen 1×10^{12} linfocitos T en un adulto sano, la dosis total propuesta es equivalente a aproximadamente al 0,5% de la masa corporal total de linfocitos T (Roedere, 1995, Nat Med, 1: 621-7, Macallan et al., 2003, Eur. J. Immunol, 33, 2316 - 26). La primera dosis se administra usando una dosis dividida en los días 0 (10%), 1 (30%) y 2 (60%). Los sujetos reciben la infusión en una habitación aislada. Las células se descongelan en la cama del paciente como se describe en otra parte del presente documento. Las células

descongeladas se administran a una velocidad de infusión tan rápidamente como se tolere, de manera que la duración de la infusión es de aproximadamente 10-15 minutos. Los linfocitos T transducidos se administran por infusión intravenosa rápida a una velocidad de flujo de aproximadamente 10 ml a 20 ml por minuto a través de un equipo de transfusión de calibre 18 de tipo Y libre de látex con una llave de paso de 3 vías. La duración de la infusión es de aproximadamente 15 minutos. Una o dos bolsas de células modificadas CART-19 se suministran sobre hielo, y las células se administran al sujeto mientras están frías. En sujetos que reciben mezclas de células CART-19, con el fin de facilitar el mezclado, las células se administran simultáneamente usando un adaptador en forma de Y. Los sujetos son infundidos y premedicados como se describe en otra parte del presente documento. Los signos vitales de los sujetos son evaluados y la oximetría de pulso se realiza antes de la dosificación, al final de la infusión y cada 15 minutos después de 1 hora y hasta que éstos sean estables y satisfactorios. Se obtiene una muestra de sangre para la determinación del nivel basal de CART-19 antes de la infusión y 20 minutos después de la infusión. Los pacientes que experimentan toxicidades de su quimioterapia citorreductora anterior tienen retrasado su programa de infusión hasta que estas toxicidades se han resuelto.

Las toxicidades específicas que justifican el retraso de las infusiones de linfocitos T incluyen: 1) Pulmonar: exigencia de oxígeno suplementario para mantener la saturación superior al 95% o presencia de anomalías radiográficas en la radiografía de tórax que sean progresivas; 2) Cardíaco: Nueva arritmia cardíaca no controlada con tratamiento médico. 3) Hipotensión que requiere soporte de presión. 4) Infección activa: hemocultivos positivos para bacterias, hongos o virus dentro de las 48 horas de infusión de linfocitos T. Se recoge una muestra de suero para el potasio y el ácido úrico antes de la primera infusión, así como dos horas después de cada infusión subsiguiente.

Análisis post-infusión para evaluar el injerto y la persistencia

Los sujetos regresan al día 4 y 10 después de la infusión de células CART-19 inicial para extraer sangre para niveles de citoquina en suero, y la PCR CART-19 para evaluar la presencia de células CART-19. Los sujetos regresan una vez a la semana durante tres semanas para someterse a lo siguiente: examen físico, documentación de eventos adversos y extracciones de sangre para análisis de hematología, química, injerto y persistencia de células CART-19 y otras pruebas de investigación.

Segunda infusión

Sin desear estar limitado por ninguna teoría en particular, se cree que una segunda dosis de células CART-19 puede administrarse el día 11 a los pacientes, siempre que presenten una tolerancia adecuada a la primera dosis y se hayan fabricado suficientes células CART-19. La dosis es $2-5 \times 10^9$ células totales. Una muestra de suero para analizar el potasio y el ácido úrico se puede recoger dos horas después de la infusión.

Segunda aféresis

Se lleva a cabo un procedimiento de aféresis de 2 litros en el centro de aféresis, se obtienen PBMC para investigación y crioconservación. Los sujetos se someten a: examen físico, documentación de eventos adversos y extracciones de sangre para hematología, química, injerto y persistencia de células CART-19 y otras pruebas de investigación. Además, se realiza un análisis de la reestadificación con el fin de proporcionar mediciones de la carga tumoral. Las pruebas de reestadificación se determinan por tipo de enfermedad e incluyen análisis de imágenes, evaluaciones de MRD, aspiración y biopsia de médula ósea y/o biopsia de ganglios linfáticos,

Evaluaciones mensuales de 2 a 6 meses después de la infusión

Los sujetos vuelven mensualmente durante los meses 2 a 6 después de la infusión de células CART-19. En estas visitas de estudio, los sujetos se someten a: medicación concomitante, examen físico, documentación de eventos adversos y extracciones de sangre para hematología, química, injerto y persistencia de células CART-19 y otras pruebas de investigación. El ensayo de ADN de para VIH se realiza a los meses 2-6 después de la infusión de células CART-19 para excluir la presencia de RCL detectable.

Evaluaciones trimestrales hasta 2 años después de la infusión

Los sujetos son evaluados trimestralmente hasta 2 años después de la infusión. En estas visitas de estudio, los sujetos se someten a: medicación concomitante, examen físico, documentación de eventos adversos y extracciones de sangre para hematología, química, injerto y persistencia de células CART-19 y otras pruebas de investigación. El ensayo de ADN de HIV se realiza a los meses 3 y 6 después de la infusión de células CART-19 para excluir la presencia de RCL detectable.

Ahora se describen los resultados de los experimentos.

Historial del paciente

El paciente recibió un diagnóstico de LLC en estadio I en 1996. Primero requirió tratamiento después de 6 años de observación para leucocitosis progresiva y adenopatía. En 2002, fue tratado con dos ciclos de rituximab más fludarabina; este tratamiento resultó en la normalización de los recuentos sanguíneos y la resolución parcial de la adenopatía. En 2006, recibió cuatro ciclos de rituximab y fludarabina para la progresión de la enfermedad, nuevamente con la normalización de los recuentos sanguíneos y la regresión parcial de la adenopatía. Esta respuesta fue seguida por un intervalo libre de progresión de 20 meses y un intervalo libre de tratamiento de 2 años. En febrero de 2009 tuvo leucocitosis progresiva y adenopatía recurrente. Su médula ósea estaba extensamente infiltrada con LLC. El análisis citogenético mostró que 3 de las 15 células contenían una delección del cromosoma 17p y la hibridación in situ por fluorescencia (FISH) mostró que 170 de 200 células tenían una delección que implicaba TP53 en el cromosoma 17p. Recibió rituximab con bendamustina durante un ciclo y tres ciclos adicionales de bendamustina sin rituximab (debido a una reacción alérgica grave). Este tratamiento dio como resultado sólo una mejora transitoria en la linfocitosis. La adenopatía progresiva se documentó mediante tomografía computarizada (CT) después de la terapia.

Los linfocitos T autólogos se recogieron por medio de leucaféresis y se crioconservaron. El paciente recibió entonces alemtuzumab (anti-CD52, linfocitos maduros, antígeno de superficie celular) durante 11 semanas, con hematopoyesis mejorada y resolución parcial de la adenopatía. Durante los siguientes 6 meses tuvo una enfermedad estable con médula persistente y extensa y adenopatía difusa con múltiples ganglios linfáticos de 1 a 3 cm. En julio de 2010, el paciente se inscribió en un ensayo clínico de fase 1 de linfocitos T con receptor de antígeno quimérico modificado.

Infusiones de células

Los linfocitos T autólogos del paciente se descongelaron y transdujeron con lentivirus para expresar el receptor de antígeno quimérico específico de CD19 (Figura 12A); los identificadores de secuencia para el vector lentiviral y las secuencias relevantes se describen en la Tabla 5. Cuatro días antes de la infusión celular, el paciente recibió quimioterapia diseñada para el agotamiento de linfocitos (pentostatina a una dosis de 4 mg por metro cuadrado de superficie corporal y ciclofosfamida a una dosis de 600 mg por metro cuadrado) sin rituximab (Lamanna et al., 2006, J Clin Oncol, 24: 1575-81). Tres días después de la quimioterapia, pero antes de la infusión celular, la médula ósea era hiper celular con una afectación aproximada del 40% por LLC. Las células de leucemia expresaron cadena ligera kappa y CD5, CD19, CD20 y CD23. El análisis citogenético mostró dos clones separados, ambos resultando en la pérdida del cromosoma 17p y el locus TP53 (46, XY, del(17)(p12)[51/46, XY, del(17)t(17;21)(q10;q10)[5]/46, XY[14]). Cuatro días después de la quimioterapia, el paciente recibió un total de 33×10^8 linfocitos T, de las cuales el 5% fueron transducidos, para un total de $1,42 \times 10^7$ células transducidas ($1,46 \times 10^5$ células por kilogramo) divididas en tres infusiones intravenosas diarias consecutivas (10% el día 1, 30% el día 2 y 60% el día 3). No se administraron citoquinas postinfusión. No se observaron efectos tóxicos de las infusiones.

Tabla 5: Identificadores de secuencia para el vector de transferencia pELPS-CD19-BBz

Nº de Id. de Sec.	IDENTIDAD
Id. de Sec. Nº: 1	vector de transferencia pELPS-CD19-BBz (secuencia de ácido nucleico)
Id. de Sec. Nº: 2	U3 de VRS (secuencia de ácidos nucleicos)
Id. de Sec. Nº: 3	Repetición del VIH R (secuencia de ácidos nucleicos)
Id. de Sec. Nº: 4	Repetición del VIH U5 (secuencia de ácidos nucleicos)
Id. de Sec. Nº: 5	Gag/Pol parcial (secuencia de ácidos nucleicos)
Id. de Sec. Nº: 6	cPPT (secuencia de ácido nucleico)
Id. de Sec. Nº: 7	promotor EF1 alfa (secuencia de ácido nucleico)
Id. de Sec. Nº: 8	CD19-BBzeta CAR (secuencia de ácido nucleico)
Id. de Sec. Nº: 9	PRE Hu de marmota americana (secuencia de ácido nucleico) t
Id. de Sec. Nº: 10	repetición R (secuencia de ácido nucleico)
Id. de Sec. Nº: 11	repetición U5 (secuencia de ácido nucleico)
Id. de Sec. Nº: 12	CD19-BBzeta CAR (secuencia de aminoácidos)
Id. de Sec. Nº: 13	Líder CD8 (secuencia de ácido nucleico)
Id. de Sec. Nº: 14	anti CD19scFv (secuencia ácido nucleico)
Id. de Sec. Nº: 15	bisagra CD8 (secuencia de ácido nucleico)
Id. de Sec. Nº: 16	transmembrana CD8 (secuencia de ácido nucleico)
Id. de Sec. Nº: 17	4-1BB (secuencia de ácido nucleico)
Id. de Sec. Nº: 18	CD3zeta (secuencia de aminoácidos)
Id. de Sec. Nº: 19	Líder CD8 (secuencia de aminoácidos)
Id. de Sec. Nº: 20	anti CD19scFv (secuencia de aminoácidos)
Id. de Sec. Nº: 21	bisagra CD8 (secuencia de aminoácidos)
Id. de Sec. Nº: 22	transmembrana CD8 (secuencia de aminoácidos)

Id. de Sec. Nº: 23	4-1BB (secuencia de aminoácidos)
Id. de Sec. Nº: 24	CD3zeta (secuencia de aminoácidos)

Respuesta clínica y evaluaciones

5 Catorce días después de la primera infusión, el paciente comenzó a tener escalofríos y fiebre ligera asociada con fatiga de grado 2. Durante los siguientes 5 días, los escalofríos se intensificaron y su temperatura aumentó a 39,2 °C (102,5 °F), asociada con rigidez, diaforesis, anorexia, náuseas y diarrea. No tenía síntomas respiratorios o cardíacos. Debido a las fiebres, se realizaron radiografías de tórax y cultivos de sangre, orina y heces y todas fueron negativas o normales. El síndrome de lisis tumoral se diagnosticó al día 22 después de la infusión (Figura 12B). El nivel de ácido úrico fue de 10,6 mg por decilitro (630,5 µmol por litro), el nivel de fósforo fue de 4,7 mg por decilitro (1,5 mmol por litro) (rango normal, 2,4 a 4,7 mg por decilitro [0,8 a 1,5 mmol por litro]), y el nivel de lactato deshidrogenasa fue 1130 U por litro (intervalo normal, 98 a 192). Hubo evidencia de lesión renal aguda, con un nivel de creatinina de 2,60 mg por decilitro (229,8 µmol por litro) (nivel basal, <1,0 mg por decilitro [< 88,4 µmol por litro]). La paciente fue hospitalizada y tratada con reanimación fluida y rasburicasa. El nivel de ácido úrico regresó al rango normal al cabo de 24 horas, y el nivel de creatinina en 3 días; fue dado de alta del hospital el día 4. El nivel de lactato deshidrogenasa disminuyó gradualmente, volviéndose normal durante el mes siguiente.

20 Al día 28 después de la infusión de células CART19, la adenopatía ya no era palpable, y al día 23, no había evidencia de LLC en la médula ósea (Figura 12C). El cariotipo era normal en 15 de 15 células (46, XY), y la prueba FISH fue negativa para la delección TP53 en 198 de 200 células examinadas; esto se considera que está dentro de los límites normales en controles negativos. El análisis por citometría de flujo no mostró LLC residual y los linfocitos B no fueron detectables (<1% de células dentro de la selección de linfocitos CD5+CD10-CD19+CD23+). El escáner por TC realizado el día 31 después de la infusión mostró una resolución de la adenopatía (Figura 12D).

25 Tres y seis meses después de la infusión de células CART19, el examen físico permaneció sin hallazgos significativos, sin adenopatía palpable, y la tomografía computarizada realizada 3 meses después de la infusión de células CART19 mostró remisión sostenida (Figura 12D). Los estudios de médula ósea a los 3 y 6 meses tampoco mostraron evidencia de LLC por medio de análisis morfológico, análisis de cariotipo (46, XY), o análisis de citometría de flujo, con una continua falta de linfocitos B normales. La remisión se mantuvo durante al menos 10 meses.

Toxicidad de las células CART 19

35 Las infusiones celulares no tuvieron efectos tóxicos agudos. El único evento adverso grave (grado 3 ó 4) que se observó fue el síndrome de lisis tumoral de grado 3 descrito anteriormente. El paciente tenía linfopenia de grado 1 al inicio y linfopenia de grado 2 o 3 comenzando el día 1 y continuando por lo menos 10 meses después del tratamiento. La linfopenia de grado 4, con un recuento absoluto de linfocitos de 140 células por milímetro cúbico, se registró el día 19, pero desde el día 22 hasta al menos 10 meses, el recuento absoluto de linfocitos osciló entre 390 y 780 células por milímetro cúbico (grado 2 ó 3 de linfopenia). El paciente presentó trombocitopenia transitoria de grado 1 (recuento de plaquetas, 98.000 a 131.000 por milímetro cúbico) desde el día 19 hasta el día 26 y neutropenia grado 1 o 2 (recuento absoluto de neutrófilos, 1090 a 1630 por milímetro cúbico) del día 17 al día 33. Otros signos y síntomas que probablemente estaban relacionados con el tratamiento del estudio incluyeron elevaciones de grado 1 y 2 en los niveles de aminotransferasa y fosfatasa alcalina, que se desarrollaron 17 días después de la primera infusión y se resolvieron el día 33. Los síntomas constitucionales de grado 1 y 2 consistían en fiebres, diaforesis, mialgias, dolor de cabeza y fatiga. La hipogammaglobulinemia de grado 2 se corrigió con infusiones de inmunoglobulina intravenosa.

Análisis de citoquinas en suero y médula ósea

50 La respuesta clínica del paciente fue acompañada por un aumento retardado en los niveles de citoquinas inflamatorias (Figura 13A a Figura 13D), con niveles de interferón- γ , quimioquinas CXCL9 y CXCL10 respondedoras a interferón- γ y la interleuquina-6 que fueron 160 veces más alto que los niveles basales. El aumento temporal de los niveles de citoquinas fue paralelo a los síntomas clínicos, alcanzando un máximo entre los 17 y 23 días después de la primera infusión de células CART19.

60 Los sobrenadantes de los aspirados en serie de médula ósea se midieron para las citoquinas y mostraron evidencia de activación inmune (Figura 13E). Se observaron incrementos significativos en interferón- γ , CXCL9, interleuquina-6 y receptor soluble de interleuquina-2, en comparación con los niveles basales del día anterior a la infusión de linfocitos T; los valores alcanzaron su máximo al día 23 después de la primera infusión de células CART19. El aumento de las citoquinas de la médula ósea coincidió con la eliminación de las células leucémicas de la médula ósea. El factor α de necrosis tumoral y de médula ósea permanecieron sin cambios.

Expansión y persistencia de linfocitos T con receptores de antígeno quimérico

La PCR en tiempo real detectó ADN que codifica el receptor de antígeno quimérico anti-CD19 (CAR19) a partir del día 1 después de la primera infusión (Figura 14A). Se observó más de una expansión de 3 log de las células in vivo al día 21 después de la infusión. A niveles máximos, las células CART19 en sangre representaban más del 20% de los linfocitos circulantes; estos niveles máximos coincidieron con la aparición de síntomas constitucionales, el síndrome de lisis tumoral (Figura 12B) y elevaciones en los niveles séricos de citoquinas (Figura 13A a Figura 13D). Las células CART19 permanecieron detectables a niveles altos 6 meses después de las infusiones, aunque los valores disminuyeron en un factor de 10 desde los niveles máximos. El tiempo de duplicación de los linfocitos T con receptores de antígeno quimérico en sangre fue de aproximadamente 1,2 días, con una semivida de eliminación de 31 días.

Linfocitos T con receptor de antígeno quimérico en la médula ósea

Se identificaron células CART 19 en muestras de médula ósea comenzando 23 días después de la primera infusión (Figura 14B) y persistieron durante al menos 6 meses, con una vida media de desintegración de 34 días. Los niveles más altos de células CART19 en la médula ósea se identificaron en la primera evaluación 23 días después de la primera infusión y coincidió con la inducción de una respuesta inmune, como se indica en los perfiles de secreción de citoquinas (Figura 13E). El análisis por citometría de flujo de los aspirados de médula ósea indicó una expansión clonal de células CD5+CD19+ en la línea basal que estaba ausente 1 mes después de la infusión y en una muestra obtenida 3 meses después de la infusión (datos no mostrados). Los linfocitos B normales no se detectaron después del tratamiento (Figura 14C).

Tratamiento con células autólogas CART19 genéticamente modificadas

Se describe aquí el desarrollo tardío del síndrome de lisis tumoral y una respuesta completa 3 semanas después del tratamiento con linfocitos T autólogos modificadas genéticamente para detectar CD19 mediante transducción con un vector lentivirus que expresa los dominios de señalización anti-CD19 unido a CD3-zeta y CD137 (4-1BB). Las células genéticamente modificadas estuvieron presentes a niveles altos en la médula ósea durante al menos 6 meses después de la infusión. La generación de una respuesta inmune específica de CD19 en la médula ósea se demostró mediante la liberación temporal de citoquinas y la ablación de células de leucemia que coincidió con la infiltración máxima de linfocitos T con receptores de antígeno quimérico. El desarrollo del síndrome de lisis tumoral después de la inmunoterapia celular no se había descrito previamente (Baeksgaard et al., 2003, Cancer Chemother Pharmacol, 51: 187 - 92).

La manipulación genética de linfocitos T autólogos para detectar antígenos tumorales específicos es una estrategia atractiva para la terapia del cáncer (Sadelain et al., 2009, Curr Opin Immunol, 21: 215-23, Jena et al., 2010, Blood, 116: 1035 - 44). Una característica importante del enfoque aquí descrito es que los linfocitos T con receptores de antígeno quimérico pueden reconocer dianas tumorales de una manera no dependiente del HLA, de manera que se pueden construir receptores de antígenos quiméricos comerciales para tumores con una amplia variedad de características histológicas. Se utilizaron vectores lentivirales derivados del VIH para la terapia del cáncer, un enfoque que puede presentar algunas ventajas sobre el uso de vectores retrovirales (June et al., 2009, Nat Rev. Immunol, 9: 704-16).

En ensayos previos de linfocitos T con receptores de antígeno quimérico, las respuestas tumorales objetivas han sido modestas, y la proliferación in vivo de células modificadas no se ha mantenido (Kershaw et al., 2006, Clin Cancer Res, 12: 6106-15; et al., 2008, Blood, 112: 2261-71, Pule et al., 2008, Nat Med, 14: 1264-70). Brentjens y sus colegas describieron los resultados preliminares de un ensayo clínico de receptores de antígeno quimérico dirigidos a CD19 unidos a un dominio de señalización CD28 y encontraron respuestas tumorales transitorias en dos de tres pacientes con LLC avanzada (Brentjens et al., 2010, Mol Ther, 18: 666 -8); sin embargo, los receptores de antígeno quiméricos desaparecieron rápidamente de la circulación.

Es inesperado que las dosis tan bajas de linfocitos T con receptores de antígeno quimérico que fueron infundidas resultara en una respuesta antitumoral clínicamente evidente. De hecho, la dosis infundida de $1,5 \times 10^5$ linfocitos T con receptor de antígeno quimérico por kilogramo fue varios órdenes de magnitud por debajo de las dosis usadas en estudios previos de linfocitos T modificados para expresar receptores de antígeno quiméricos o receptores de linfocitos T transgénicos (Kershaw et al. Res, 12: 6106-15, Brentjens et al., 2010, Mol Ther, 18: 666-8, Morgan et al., 2010, Mol Ther, 18: 843-51, Johnson et al., 2009, Blood, 114: 535-46). Sin estar sujeto a ninguna teoría en particular, se especula que la quimioterapia puede potenciar los efectos del receptor de antígeno quimérico.

La prolongada persistencia de células CART19 en la sangre y médula ósea del paciente resulta de la inclusión del dominio de señalización 4-1BB. Es probable que la eliminación mediada por células CART19 de linfocitos B normales facilite la inducción de tolerancia inmunológica al receptor de antígeno quimérico, ya que las células CART 19 que expresan el fragmento de anticuerpo Fv de cadena única que contiene secuencias murinas no se rechazaron. Dada la ausencia de células leucémicas CD19 positivas detectables en este paciente, y sin estar

5 sujeto a ninguna teoría en particular, es posible que la homeostasis de los linfocitos T con receptores de antígeno quimérico se consiga al menos en parte de la estimulación suministrada por progenitores tempranos de linfocitos B cuando comenzaron a emerger en la médula ósea. La invención se refiere al descubrimiento de que puede existir un nuevo mecanismo para mantener linfocitos T con receptor de antígeno quimérico de "memoria".

10 Aunque CD19 es una diana tumoral atractiva, con una expresión limitada a linfocitos B normales y malignos, existe la preocupación de que la persistencia de los linfocitos T con receptores de antígeno quimérico pueda mediar la deficiencia de linfocitos B a largo plazo. De hecho, en el paciente, los linfocitos B estaban ausentes de la sangre y la médula ósea durante al menos 6 meses después de la infusión. Este paciente no tenía infecciones recurrentes. La selección de los linfocitos B a través de CD20 con rituximab es una estrategia eficaz y relativamente segura para los pacientes con neoplasias de linfocitos B, y la linfopenia de linfocitos B a largo plazo es manejable (Molina, 2008, Ann Rev Med, 59: 237-50). Se ha informado que los pacientes tratados con rituximab tienen un retorno de los linfocitos B unos meses después de suspender el tratamiento. Todavía no está claro si dicha recuperación se produce en pacientes cuyos linfocitos T anti-linfocitos B persisten in vivo.

15 Los pacientes que tienen LLC con deleciones de TP53 tienen remisiones cortas después de terapias estándar (Dohner et al., 1995, Blood, 85: 1580-9). El trasplante alogénico de médula ósea ha sido el único enfoque que ha inducido remisiones a largo plazo en pacientes con LLC avanzada (Gribben et al., 2011, Biol Blood Marrow Transplant, 17: Supl: S63-S70). Sin embargo, el potente efecto de injerto contra tumor se asocia con una morbilidad considerable debido a la alta frecuencia de la enfermedad crónica de injerto contra huésped, que a menudo es especialmente grave en los pacientes de edad avanzada que son normalmente los más afectados por LLC (Gribben et al., 2011, Biol Blood Marrow Transplant, 17: Supl: S63 - S70, Sorror et al., 2008, Blood, 111: 446-52). Los datos presentados aquí sugieren que los linfocitos T autólogos genéticamente modificados pueden eludir esta limitación.

20 El inicio tardío del síndrome de lisis tumoral y la secreción de citoquinas, combinada con una vigorosa expansión de linfocitos T con receptor de antígeno quimérico in vivo y la actividad antileucemia prominente, apunta a funciones efectoras sustanciales y sostenidas de las células CART19. Los experimentos aquí descritos destacan la potencia de esta terapia y proporcionan soporte para el estudio detallado de linfocitos T autólogos modificados genéticamente para dirigirse contra CD19 (y otras dianas) a través de la transducción de un receptor de antígeno quimérico unido a potentes dominios de señalización. A diferencia de la terapia mediada por anticuerpos, los linfocitos T modificados con receptor de antígeno quimérico tienen el potencial de replicarse in vivo, y la persistencia a largo plazo puede conducir a un control sostenido del tumor. Otros dos pacientes con LLC avanzada también han recibido infusiones de CART 19 de acuerdo con este protocolo, y los tres han tenido respuestas antitumorales. Estos hallazgos justifican el estudio continuo de linfocitos T redirigidos contra CD19 para neoplasias de linfocitos B.

40 Listado de secuencias

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania
 June, Carl H
 Porter, David L
 Kalos, Michael
 45 Levine, Bruce L

<120> Utilización de linfocitos T modificados con receptores de antígeno quiméricos para tratar el cáncer

50 <130> 46483-6001-00-WO.601218

<150> 61/421,470
 <151> 2010-12-09

55 <150> 61/502,649
 <151> 2010-06-29

<160> 27

60 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 9174
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65

ES 2 700 966 T3

<220>

<223> Sintetizada químicamente

<400> 1

gcgcgctoac tggcgcgtcgt tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg cgttacccaa	60
cttaatogcc ttgcagcaca tcccccttcc gccagctggc gtaatagoga agaggcccgc	120
accgatogcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatgggacgc gccctgtagc	180
ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc	240
gccctagcgc ccgctccttt cgttttcttc ccttcccttc tcgccacgtt cgcggctttt	300
ccccgtcaag ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac	360
ctcgacccca aaaaacttga ttagggtgat ggttcacgta gtgggcatc gccctgatag	420
acggtttttc gccctttgac gttggagtc acgttcttta atagtggact cttgttccaa	480
actggaacaa cactcaacc tatctcggtc tattcttttg atttataagg gattttgcgc	540
atctcggcct attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattttaac	600
aaaatattaa cgcttacaat ttaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaaccctca	660
tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat	720
aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgcgc	780
ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa acgctggtga	840
aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca	900
acagcggtaa gatccttgag agttttcggc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt	960
ttaaagtctt gctatgtggc gcggtattat ccgctattga cgcggggcaa gagcaactcg	1020
gtcgcgcgat aactattct cagaatgact tggttgagta ctaccagtc acagaaaagc	1080
atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata	1140
aaactgoggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt	1200
tcgacaacat ggggatcat gtaactcgc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag	1260

ES 2 700 966 T3

ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgccctgtagc aatggcaaca acgttgcgca 1320
aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccgga acaattaata gactggatgg 1380
aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg 1440
ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgoggat cattgcagca ctggggccag 1500
atggtaagcc ctcccgatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg 1560
aacgaaatag acagatcgt gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag 1620
accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga 1680
tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat cccttaacgt gagttttcgt 1740
tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc 1800
tgocgtaat ctgctgcttg caaacaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc 1860
cggatcaaga gctaccaact ctttttcoga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac 1920
caaatactgt tcttctagtg tagccttagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac 1980
cgctacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc tgetgccagt ggcgataagt 2040
cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct 2100
gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat 2160
acctacagcg tgagctatga gaaagcgca cgttcccga agggagaaag gcggacaggt 2220
atccgtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca ggggaaacg 2280
cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt 2340
gatgctcgtc agggggggcg agcctatgga aaaacgccag caacggggcc tttttacggt 2400
tctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg 2460
tgataaccg tattaccgc tttgagtgag ctgataccgc tcgccgagc cgaacgaccg 2520
agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcggcc aatacgcaa ccgcctctcc 2580
ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccagc tggaaagcgg 2640
gcagtgagcg caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca ttaggcaccc caggetttac 2700
actttatgct tccgctcgt atgttggtg gaattgtgag cggataaaaa tttcacacag 2760

ES 2 700 966 T3

gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc gcgcaattaa coctcactaa agggaacaaa 2820
 agctggagct gcaagcttaa tgtagtotta tgcaatacto ttgtagtctt gcaacatggc 2880
 aacgatgagt tagcaacatg ccttacaagg agagaaaaag cacogtgcac gccgattggc 2940
 ggaagtaagg tggtagcatc gtgccttatt aggaaggcaa cagacgggtc tgacatggat 3000
 tggacgaacc actgaattgc cgcattgcag agatattgta ttttaagtgc tagctcgata 3060
 cataaacggg tctctctggc tagaccagat ctgagcctgg gagctctctg gctaactagg 3120
 gaaccactg ctttaagcctc aataaagctt gccttgagtg cttcaagtag tgtgtgcccg 3180
 tctgtttgtg gactctggta actagagatc cctcagaccc ttttagtcag tgtggaaaat 3240
 ctctagcagt ggcgcccga cagggacttg aaagcgaaag ggaaaccaga ggagctctct 3300
 cgacgcagga ctgcggcttg tgaagcgcgc acggcaagag gcgagggcg gcgactggcg 3360
 agtacgcaa aaatcttgac tagcggaggc tagaaggaga gagatgggtg cgagagcgtc 3420
 agtattaagc gggggagaat tagatcgcga tgggaaaaaa ttcggttaag gccaggggga 3480
 aagaaaaaat ataaattaa acatatagta tgggcaagca gggagctaga acgattcgca 3540
 gttaatcctg gcctgttaga aacatcagaa ggctgtagac aaatactggg acagctacaa 3600
 ccatccctc agacaggatc agaagaactt agatcattat ataatacagt agcaaccctc 3660
 tattgtgtgc atcaaaggat agagataaaa gacaccaagg aagctttaga caagatagag 3720
 gaagagcaaa acaaaagtaa gaccaccgca cagcaagcgg ccgctgatct tcagacctgg 3780
 aggaggagat atgagggaca attggagaag tgaattatat aaatataaag tagtaaaaat 3840
 tgaaccatta ggagtagcac ccaccaaggc aaagagaaga gtggtgcaga gagaaaaaag 3900
 agcagtggga ataggagctt tgttccttgg gttcttggga gcagcaggaa gcactatggg 3960
 cgcagcgtca atgacgctga cggtagaggc cagacaatta ttgtctggta tagtgcagca 4020
 gcagaacaat ttgctgaggg ctattgaggc gcaacagcat ctgttgcaac tcacagtctg 4080
 gggcatcaag cagctccagg caagaatcct ggctgtggaa agatacctaa aggatcaaca 4140
 gctcctgggg atttgggggt gctctggaaa actcatttgc accactgctg tgccctggaa 4200
 tgctagtgg agtaataaat ctctggaaca gatttggat cacacgacct ggatggagtg 4260
 ggacagagaa attaacaatt acacaagctt aatacactcc ttaattgaag aatcgcaaaa 4320
 ccagcaagaa aagaatgaac aagaattatt ggaattagat aaatgggcaa gtttgtggaa 4380
 ttggtttaac ataacaatt ggctgtggta tataaatta ttcataatga tagtaggagg 4440
 cttggtaggt ttaagaatag ttttgcctgt actttctata gtgaatagag ttaggcaggg 4500
 atattcacca ttatcgttcc agaccacct cccaaccocg aggggaccocg acaggcccga 4560

ES 2 700 966 T3

aggaatagaa gaagaaggtg gagagagaga cagagacaga tccattogat tagtgaacgg 4620
 atotogacgg tatogattag actgtagccc aggaatatgg cagctagatt gtacacattt 4680
 agaaggaaaa gttatcttgg tagcagttca tgtagccagt ggatatatag aagcagaagt 4740
 aattocagca gagacagggc aagaaacagc atacttctc ttaaaattag caggaagatg 4800
 gccagtaaaa acagtacata cagacaatgg cagcaatttc accagtacta cagttaaggc 4860
 cgctgttgg tggcgggga tcaagcagga atttggcatt ccctacaatc cccaaagtca 4920
 aggagtaata gaatctatga ataaagaatt aaagaaaatt ataggacagg taagagatca 4980
 ggotgaacat cttaaagacag cagtacaaat ggcagtatc atccacaatt ttaaaagaaa 5040
 aggggggatt ggggggtaca gtgcagggga aagaatagta gacataatag caacagacat 5100
 acaactaaa gaattacaaa aacaaattac aaaaattcaa aattttcggg tttattacag 5160
 ggacagcaga gatocagtti ggcctgcattg atcacgtgag gctccgggtgc cagtcagtgg 5220
 gcagagcgca catogcccac agtccccgag aagttggggg gaggggtcgg caattgaacc 5280
 ggtgocctaga gaaggtggcg cggggtaaac tgggaaagtg atgtcgtgta ctggctccgc 5340
 cttttcccg aggggtgggg agaaccgtat ataagtgcag tagtcgcctg gaacgttctt 5400
 tttogcaacg ggtttgccc cagaacacag gtaagtgcg tgtgtggttc ccgogggcoct 5460
 ggctcttta cgggttatgg ccttgcctg ccttgaatta ctccacctg gctgcagtac 5520
 gtgattottg atcccagct tcgggttga agtggtggg agagtccag gccttgcct 5580
 taaggagccc cttegcctcg tgettgagtt gaggcctggc ctgggcctg gggccgccgc 5640
 gtgcgaatct ggtggcact tcgcgcctgt ctgcctgctt tcgataagtc tctagccatt 5700
 taaaattttt gatgacctgc tgcgacgctt tttttctggc aagatagtct tgtaaatgcg 5760
 ggccaagatc tgcacactgg tatttcggtt tttggggcgg cgggoggoga cggggcccgt 5820
 ggcctccagc gcacatgttc ggcgagggc ggccctgcag cggggccacc gagaatcoga 5880
 cgggggtagt ctcaagctgg ccggcctgct ctggtgctg gcctcggcc gcctgtatc 5940
 gccccgccct gggcggcaag gctggcccgg tcggcaccag ttgcctgagc ggaaagatgg 6000
 ccgcttcccg gcctgctgc agggagctca aatggagga cggggcctc gggagagcgg 6060
 gcgggtgagt cacccacaca aaggaaaagg gccttccgt cctcagccgt cgttcatgt 6120
 gaotccactg agtaccggc gccgtccagg cacctcagatt agttctcag cttttggagt 6180
 acgtcgtctt taggttgggg ggaggggtt tatgcgatgg agtttccca cactgagtgg 6240
 gtggagactg aagttaggcc agcttggcac ttgatglaat tctccttga atttgccctt 6300
 tttgagtttg gatcttgggt cattctcaag cctcagacag tggttcaaag ttttttctt 6360
 ccatttcagg tgtcgtgato tagaggatcc atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg 6420

ES 2 700 966 T3

cegctggcct tgetgctcca cgccgccagg ccggacatcc agatgacaca gactacatcc 6480
 tccctgtctg cctctctggg agacagagtc accatcagtt gcagggcaag tcaggacatt 6540
 agtaaatatt taaattggta tcagcagaaa ccagatggaa ctgttaaact cctgatctac 6600
 catacatcaa gattacaactc aggagtccca tcaaggttca gtggcagtgg gtctggaaca 6660
 gattattctc tcaccattag caacctggag caagaagata ttgccactta cttttgccaa 6720
 cagggtaata cgcttcogta cacgttcogga ggggggacca agctggagat cacaggtggo 6780
 ggtggctcgg gcgggtggtg gtccgggtggc ggcggatctg aggtgaaact gcaggagtca 6840
 ggacctggcc tgggtggcgc ctcacagagc ctgtccgtca catgcactgt ctcaggggtc 6900
 tcattaccog actatggtgt aagctggatt cgcagcctc cacgaaaggg tctggagtgg 6960
 ctgggagtaa tatggggtag tgaaccaca tactataatt cagctctcaa atccagactg 7020
 accatcataa aggacaaactc caagagccaa gttttcttaa aaatgaacag tctgcaaaact 7080
 gatgacacag ccatttacta ctgtgccaaa cattattact acggtggtag ctatgctatg 7140
 gactactggg gccaaagAAC ctcagtcacc gtctcctcaa ccacgacgcc agcgcgcgca 7200
 ccaccaaac cgccgccccac catcgcgtcg cagccctgt cctgcgcgcc agaggcgtgc 7260
 cggccagcgg cggggggcgc agtgcacacg agggggctgg acttcgcctg tgatatctac 7320
 atctgggcgc ccttggccgg gacttgtggg gtccctctcc tgtcactggt taccaccctt 7380
 tactgcaaac ggggcagaaa gaaactcctg tataatattca aacaaccatt tatgagacca 7440
 gtacaaacta ctcaagagga agatggctgt agctccgat ttccagaaga agaagaagga 7500
 ggatgtgaac tgagagtga gttcagcagg agcgcagacg cccccgcgta caagcagggc 7560
 oagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga tgttttggac 7620
 aagagacgtg gccgggacc tgagatgggg ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa 7680
 ggctgtaca atgaactgca gaaagataag atggcggagg cctacagtga gattgggatg 7740
 aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac gatggccttt accaggtct cagtacagcc 7800
 accaaggaca cctacgacgc ccttcacatg caggccctgc ccctcgcta agtcgacaat 7860
 caacctctgg attacaaaat ttgtgaaaga ttgactggtt ttcttaacta tgttgcctct 7920
 tttacgctat gtggatacgc tgctttaatg cctttgtatc atgctattgc ttccogtatg 7980
 gctttcattt tctcctcctt gtataaatcc tggttgctgt ctctttatga ggagttgtgg 8040
 cccgttgtca ggcaacgtgg cgtggtgtgc actgtgtttg ctgacgcaac ccccactggt 8100
 tggggcattg ccaccacctg tcagctcctt tccgggactt tcgctttccc cctccctatt 8160
 gccacggcgg aactcatcgc cgctgcctt gcccgctgct ggacaggggc tcggctgttg 8220

ES 2 700 966 T3

ggcaactgaca attccgtggt gttgtcgggg aagctgacgt cctttccatg gctgctcgcc 8280
 tgtgttgcca cctggattct gcgcgggacg tccttctgct acgtcccttc ggccctcaat 8340
 ccagcggacc ttccttcccg cggcctgctg ccggctctgc ggcctcttc gcgtcttcgc 8400
 cttcgccttc agaogagtog gatctccctt tgggcccctt ccccgctgg aattogagct 8460
 cggtagccttt aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaaag 8520
 aaaagggggg actggaaggg ctaattcact cccaacgaag acaagatctg ctttttgcct 8580
 gtaactgggtc tctctgggta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactagggg 8640
 acccaactgct taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgtc tcaagtagtg tgtgcccgtc 8700
 tgttgtgtga ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct 8760
 ctagcagtag tagttcatgt catcttatta ttcagtattt ataacttgca aagaaatgaa 8820
 tatcagagag tgagaggaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata 8880
 gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcaactgca ttctagttgt ggtttgcca 8940
 aactcatcaa tgtatcttat catgtctggc tctagctatc ccgcccctaa ctccgccc 9000
 cccgccccta actccgcca gttccgcca ttctccgcc catggctgac taattttttt 9060
 tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg 9120
 cttttttgga ggcctagggg cgtacccaat tcgcctata gtgagtcgta ttac 9174

<210> 2

<211> 228

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizada químicamente

10 <400> 2

atgtagtctt atgcaatact cttgtagtct tgcaacatgg taacgatgag ttagcaacat 60

gccttacaag gagagaaaaa gcaccgtgca tgccgattgg tggagtaag gtggtacgat 120

cgtgccttat taggaaggca acagacgggt ctgacatgga ttggacgaac caotgaattg 180

ccgcattgca gagatattgt atttaagtgc ctagctcgat acataaac 228

<210> 3

15 <211> 98

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Sintetizada químicamente

<400> 3

ES 2 700 966 T3

5 gggtctctct ggtagacca gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaaccca 60
 ctgcttaage ctcaataaag cttgccttga gtgcttca 98
 <210> 4
 <211> 85
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Sintetizada químicamente

 <400> 4
 agtagtgtgt gccogtctgt tgtgtgactc tggtaactag agatccctca gacccttita 60
 gtcagtgtgg aaaatctcta gcagt 85
 15 <210> 5
 <211> 1377
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sintetizada químicamente

 <400> 5
 25 cgaacagggga cttgaaagcg aaagggaaac cagaggagct ctctcgacgc aggactoggc 60
 ttgctgaagc ggcacagcca agagggcaggg ggcggcgact ggtgagtaag ccaaaaattt 120
 tgactagcgg aggctagaag gagagagatg ggtgagagag cgtcagtatt aagcggggga 180
 gaattagatc gcgatgggaa aaaattcggg taagccaggg gggaaagaaa aaatataaat 240
 taaaacatat agtatgggca agcagggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggcctgt 300
 tagaaacatc agaaggctgt agacaaatac tgggacagct acaaccatcc ctccagacag 360
 gatcagaaga acttagatca ttatataata cagtagcaac cctctattgt gtgcatcaaa 420
 ggatagagat aaaagacacc aaggaagcct tagacaagat agaggaagag caaaacaaaa 480
 gtaagaccac cgcacagcaa gcggccgctg atcttcagac ctggaggagg agatatgagg 540
 gacaattgga gaagtgaatt atataaatat aaagtagtaa aaattgaacc attaggagta 600
 gcaccacca aggcaaagag aagagtgggt cagagagaaa aaagagcagt gggaatagga 660
 gctttgttcc ttgggttctt gggagcagca ggaagcacta tgggagcagc gtcaatgacg 720
 ctgacggtae aggcagaca attattgtct ggtatagtgc agcagcagaa caatttgctg 780
 agggtatttg aggcgcaaca gcattctgtt caactcacag tctggggcat caagcagctc 840
 caggcaagaa tcttggtgtg ggaaagatac ctaaaggatc aacagctcct ggggatttgg 900
 ggttgctctg gaaaactcat ttgcaccact gctgtgcctt ggaatgctag ttggagtaat 960
 aaatctctgg aacagatttg gaatcacacg acctggatgg agtgggacag agaaattaac 1020

ES 2 700 966 T3

aattacacaa gcttaataca ctccttaatt gaagaatogc aaaaccagca agaaaagaat 1080
 gaacaagaat tattggaatt agataaatgg gcaagtttgt ggaattgggt taacataaca 1140
 aattggctgt ggtatataaa attattcata atgatagtag gaggcttggg aggtttaaga 1200
 atagtttttg ctgtactttc tatagtgaat agagttaggc agggatatto accattatcg 1260
 tttcagaccc aacctccaac cccgagggga cccgacaggc ccgaaggaat agaagaagaa 1320
 ggtggagaga gagacagaga cagatccatt cgattagtga acggatctcg acggtat 1377

<210> 6
 <211> 547
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintetizada químicamente

<400> 6

tagactgtag cccaggaata tggcagctag attgtacaca tttagaagga aaagttatct 60
 tggtagcagt tcatgtagcc agtggatata tagaagcaga agtaattcca gcagagacag 120
 ggcaagaaac agcatacttc ctcttaaaat tagcaggaag atggccagta aaaacagtac 180
 atacagacaa tggcagcaat ttcaccagta ctacagttaa ggccgcctgt tgggtgggagg 240
 ggatcaagca ggaatttggc attcoctaca atccccaaag tcaaggagta atagaatcta 300
 tgaataaaga attaaagaaa attataggac aggtaagaga tcaggctgaa catcttaaga 360
 cagcagtaca aatggcagta ttcattocaca attttaaaag aaaagggggg attgggggggt 420
 acagtgcagg gaaagaata gtagacataa tagcaacaga catacaaaact aaagaattac 480
 aaaaacaat tacaaaaatt caaaattttc gggtttatta cagggacagc agagatccag 540
 tttggct 547

<210> 7
 <211> 1178
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintetizada químicamente

<400> 7

gctcgggtgc ccgtcagtg gacagagcga catcgccac agtccccag aagttggggg 60
 gaggggtcgg caattgaacc ggtgcctaga gaaggtggcg cggggtaaac tgggaaagtg 120
 atgtcgtgta ctggctccgc ctttttcccg aggggtgggg agaaccgtat ataagtgcag 180
 tagtcgccgt gaacgttctt tttcgcacg ggtttgccgc cagaacacag gtaagtgccg 240
 tgtgtgggtc ccgcgggcct ggcctcttta cgggttatgg cccttgcgtg ccttgaatta 300

ES 2 700 966 T3

cttccacctg gctgcagtac gtgattcttg atcccagact tcgggttggg agtgggtggg 360
 agagttogag gccttgccgt taaggagccc ctctgcctcg tgcttgagtt gaggcctggc 420
 ctgggcgctg gggccgcccg gtgcgaatct ggtggcacct tcgcccctgt ctgctgctt 480
 togataagtc tctagccatt taaaatcttt gatgacctgc tgcgacgctt tttttctggc 540
 aagatagtct tgtaaatgcg ggccaagatc tgcacactgg tatttcggtt tttggggccg 600
 cggggggcga cggggcccgt gcgtcccagc gcacatgttc ggcgaggcgg ggccctgcgag 660
 cgcggccacc gagaatcggg cgggggtagt ctcaagctgg ccggcctgct ctggtgcctg 720
 gcctcgcgcc gccgtgtatc gcccccctt gggcggcaag gctggcccgg tcggcaccag 780
 ttgcgtgagc ggaaagatgg ccgcttcccg gccctgctgc agggagctca aaatggagga 840
 cgcggcgctc gggagagcgg gcgggtgagt caccacaca aaggaaaagg gcctttccgt 900
 cctcagccgt cgttcatgt gactccactg agtaccgggc gccgtccagg cacctcgatt 960
 agttctcgag cttttggagt acgtcgtctt taggttgggg ggaggggttt tatgcgatgg 1020
 agtttcccca cactgagtgg gtggagactg aagttaggcc agcttggcac ttgatgtaat 1080
 tctccttggg atttgccctt tttgagtttg gatcttgggt cattctcaag cctcagacag 1140
 tggttcaaag ttttttctt ccatttcagg tctcgtga 1178

<210> 8

5 <211> 1459

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Sintetizada químicamente

<400> 8

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgetgctcca cgcggccagg 60
 ccggacatcc agatgacaca gactacatcc tcctgtctg cctctctggg agacagagtc 120
 accatcagtt gcagggcaag tcaggacatt agtaaatatt taaattggta tcagcagaaa 180
 ccagatggaa ctgttaaact cctgatctac catacatcaa gattacactc aggagtccca 240
 tcaaggttca gtggcagtgg gtctggaaca gattattctc tcaccattag caacctggag 300
 caagaagata ttgccacta cttttgcca cagggttaata cgttccgta cacgttcgga 360
 ggggggacca agctggagat cacaggtggc ggtggctcgg gcggtgggtg gtcgggtggc 420
 ggcggatctg aggtgaaact gcaggagtca ggacctggcc tgggtggcgc ctcacagagc 480
 ctgtcogtca catgcaactg ctacggggtc tcattaccoc actatgggtg aagctggatt 540
 cgcagcctc cacgaaaggg totggagtgg ctgggagtaa tatggggtag tgaaccaca 600

ES 2 700 966 T3

tactataatt cagctctcaa atccagactg accatcatca aggacaacto caagagccaa 660
 gttttcttaa aatgaacag tctgcaaact gatgacacag ccatttacta ctgtgccaaa 720
 cattattact acggtggtag ctatgctatg gactactggg gccaaaggaac ctcagtcacc 780
 gtctctctcaa ccacgacgcc agcgccggga ccaccaacac cggcgcccaac catcgcgctg 840
 cagcccctgt ccctgcgccc agaggcgtgc cggccagcgg cggggggcgc agtgcacacg 900
 agggggctgg acttcgctg tgatatctac atctgggcgc ccttggcggg gacttgtggg 960
 gtctctctcc tgctactggt tatcaacctt tactgcaaac ggggcagaaa gaaactcctg 1020
 tatatatcca aacaaccatt tatgagacca gtacaaacta ctcaagagga agatggctgt 1080
 agctgcgat ttccagaaga agaagaagga ggatgtgaac tgagagtga gttcagcagg 1140
 agcgcagacg ccccgcgta caagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta 1200
 ggacgaagag aggagtacga tgttttggac aagagacgtg gccgggacct tgagatgggg 1260
 ggaaagccga gaaggaagaa cctcaggaa ggctgtaca atgaactgca gaaagataag 1320
 atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcagc gccggagggg caaggggcac 1380
 gatggccttt accaggtct cagtacagcc accaaggaca cctacgagc ccttcacatg 1440
 caggccctgc ccctcgtc 1459

- 5 <210> 9
- <211> 591
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Sintetizada químicamente

<400> 9

atcaacctct ggattacaaa atttgtgaaa gattgactgg tattcttaac tatgttgctc 60
 cttttacgct atgtggatac gctgctttta tgccctttgta tcatgctatt gcttcccgta 120
 tggetttcat tttctctctc ttgtataaat cctggttget gtctctttat gaggagtgtg 180
 ggcccgttgt caggcaacgt ggcggtggtg gcactgtgtt tgctgacgca acccccactg 240
 gttggggcat tgccaccacc tgctcagctcc tttccgggac tttcgtttc cccctcccta 300
 ttgccacggc ggaactcacc gcgcctgcc ttgcccgctg ctggacaggg gctcggctgt 360
 tgggcactga caattccgtg gtgttgctgg ggaagctgac gtcccttcca tggctgctcg 420
 cctgtgttgc cacctggatt ctgcgcggga cgtccttctg ctacgtccct tgggccccta 480
 atccagcggc ccttccctcc cggcgctgc tgccggctct gggccctctt ccgcgtcttc 540
 gccttcgccc tcagacgagt cggatctccc tttgggccc ctccccgct g 591

ES 2 700 966 T3

<210> 10
 <211> 98
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Sintetizada químicamente
 <400> 10
 10
 gggctctctct ggtagacca gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaaccca 60
 ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgcttca 98
 <210> 11
 <211> 84
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Sintetizada químicamente
 20
 <400> 11
 agtagtggtg gcccgctctgt tgtgtgactc tggtaactag agatccctca gaccctttta 60
 gtcagtggtg aaaatctcta gcag 84
 25
 <210> 12
 <211> 486
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizada químicamente
 <400> 12
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
 20 25 30
 Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45
 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
 50 55 60
 Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
 100 105 110
 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
 115 120 125

ES 2 700 966 T3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
130 135 140

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

Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
165 170 175

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
180 185 190

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
195 200 205

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

Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys
225 230 235 240

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
245 250 255

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
260 265 270

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
275 280 285

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
290 295 300

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
305 310 315 320

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
325 330 335

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
340 345 350

Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
355 360 365

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
370 375 380

Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
385 390 395 400

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

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
420 425 430

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

ES 2 700 966 T3

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 450 455 460
 Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 465 470 475 480
 Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485

5 <210> 13
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintetizada químicamente

<400> 13

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgetgctcca cgccgccagg 60
 ccg 63

15 <210> 14
 <211> 726
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintetizada químicamente

<400> 14

gacatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60
 atcagttgca gggcaagtca ggacattagt aatatattaa attggtatca gcagaaacca 120
 gatggaactg ttaaaactcct gatctaccat acatcaagat taactcagg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240
 gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggagatcac aggtggcggt ggctcgggag gtggtgggtc gggtgccggc 360
 ggatctgagg tgaactgca ggagtcagga cctggcctgg tggcgccctc acagagcctg 420
 tccgtcacat gcactgtctc aggggtctca ttaccgact atggtgtaag ctggattcgc 480
 cagcctccac gaaaggtctt ggagtggctg ggagtaatat ggggtagtga aaccacatac 540
 tataattcag ctctcaaact cagactgacc atcatcaagg acaactccaa gagccaagtt 600
 ttcttaaaaa tgaacagtct gcaactgat gacacagcca tttactactg tgccaaacat 660
 tattactacg gtggtagcta tgcctatggac tactggggcc aaggaacctc agtcaccgtc 720

25 tctca 726

<210> 15
 <211> 135
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintetizada químicamente

ES 2 700 966 T3

<400> 15
accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgcca ccategcgtc gcagcccctg 60
tccttgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 120
gacttcgctt gtgat 135

5 <210> 16
<211> 72
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 16
atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtggggctc ttctcctgtc actggttatc 60
accctttact gc 72

<210> 17
<211> 126
<212> DNA
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

25 <400> 17
aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120
gaactg 126

<210> 18
30 <211> 336
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Sintetizada químicamente

<400> 18
agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc 60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctgaggaagg cctgtacaat 180
gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300
tacgacgcc ttcacatgca ggcctgcc cctcgc 336

ES 2 700 966 T3

<210> 19
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Sintetizada químicamente
 <400> 19
 10
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro
 20
 <210> 20
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Sintetizada químicamente
 20
 <400> 20
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu
 115 120 125
 Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys
 130 135 140
 Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg
 145 150 155 160

ES 2 700 966 T3

Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser
 165 170 175

Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile
 180 185 190

Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln
 195 200 205

Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly
 210 215 220

Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
 225 230 235 240

Ser Ser

5 <210> 21
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintetizada químicamente
 <400> 21

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr
 35 40 45

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

20 <220>
 <223> Sintetizada químicamente
 <400> 22

Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 20

25 <210> 23
 <211> 42

ES 2 700 966 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 23

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

10 <210> 24
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 24

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

25 <210> 25
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

30 <400> 25

gaaagctgac tgcccctatt tg 22

ES 2 700 966 T3

<210> 26
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> Sintetizada químicamente

<900> 26
10
gagaggaagt gctggaaca at 22

<210> 27
<211> 15
15 <212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente
20
<400> 27

ctccccagtc tcttt 15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR en el que el CAR comprende (a) un dominio de unión al antígeno que es un scFv anti-CD19 (b) una región de señalización coestimuladora 4-1BB, y (c) un dominio de señalización CD3 zeta para utilizar en un método para tratar el cáncer en un humano, en el que el scFv anti-CD19 comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 20 y/o el dominio de señalización CD3 zeta comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 24, y en el que el humano es resistente por lo menos a un agente quimioterapéutico.
- 10 2. El linfocito T para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cáncer comprende un tumor no sólido como un tumor hematológico.
3. El linfocito T para utilizar de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el cáncer es una leucemia o linfoma.
- 15 4. El linfocito T para utilizar de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la leucemia puede ser:
- (i) una leucemia aguda o una leucemia crónica; o
(ii) una leucemia linfocítica aguda.
- 20 5. El linfocito T para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cáncer puede ser:
- (i) leucemia linfocítica aguda pre-B (indicación pediátrica), leucemia linfocítica aguda en adultos, linfoma de células del manto o linfoma difuso de linfocitos B grandes;
(ii) linfoma no Hodgkin;
(iii) mieloma múltiple; o
(iv) enfermedad de Hodgkin.
- 25 6. El linfocito T para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cáncer es una leucemia linfocítica aguda.
- 30 7. Un linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR, en el que el CAR comprende (a) un dominio de unión al antígeno que es un scFv anti-CD19 (b) una región de señalización coestimuladora 4-1BB, y (c) un dominio de señalización CD3 zeta para utilizar en un método para tratar el cáncer que comprende administrar dicho linfocito T, a un humano diagnosticado con cáncer, en el que el scFv anti-CD19 comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 20 o el dominio de señalización CD3 zeta comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 24, y en el que dicho método genera una población de linfocitos T modificados genéticamente que persiste en el ser humano durante al menos ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, dos años o tres años después de la administración y en donde el ser humano es resistente por lo menos a un agente quimioterapéutico.
- 35 8. El linfocito T para utilizar de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la población persistente de linfocitos T modificados genéticamente comprende al menos una célula seleccionada del grupo que consiste de un linfocito T que se ha administrado al humano, una progenie de linfocitos T que se ha administrado al humano, y una combinación de las mismas.
- 40 9. El linfocito T para utilizar de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la población persistente de linfocitos T modificados genéticamente comprende un linfocito T de memoria.
- 45 10. Un linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR, en el que el CAR comprende (a) un dominio de unión al antígeno que es un scFv anti-CD19 (b) una región de señalización coestimuladora 4-1BB, y (c) un dominio de señalización CD3 zeta para utilizar en un método para tratar el cáncer que comprende administrar dicho linfocito T, a un humano diagnosticado con cáncer, en el que el scFv anti-CD19 comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 20 o el dominio de señalización CD3 zeta comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 24, y en el que dicho método expande una población de linfocitos T modificados genéticamente en el ser humano y en donde el ser humano es resistente por lo menos a un agente quimioterapéutico.
- 50 11. El linfocito T para utilizar de acuerdo con la reivindicación 10, en el que los linfocitos T modificados genéticamente administrados genera una progenie de linfocitos T en el humano que comprende un linfocito T de memoria.
- 55 12. El linfocito T para utilizar de acuerdo con la reivindicación 10, en el que los linfocitos T modificados genéticamente administrados generan una población de progenie de linfocitos T que persiste en el humano durante al menos tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, dos años o tres años después de la administración.
- 60 65

ES 2 700 966 T3

13. El linfocito T para utilizar de acuerdo con las reivindicaciones 7-12, en el que el cáncer es como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 2-5 o en el que el cáncer es una leucemia linfocítica crónica.
- 5 14. El linfocito T para utilizar de acuerdo con las reivindicaciones 6, 7 o 10, en el que el humano tiene una leucemia linfocítica crónica que es una leucemia CD19+ refractaria y linfoma.
15. El linfocito T para utilizar de acuerdo con las reivindicaciones 1-14, en el que el linfocito T es una célula autóloga o alogénica.
- 10 16. El linfocito T para utilizar de acuerdo con las reivindicaciones 1-15, en el que dicha célula se administra después de terapia ablativa de linfocitos B, tal como con agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan.
- 15 17. El linfocito T para utilizar de acuerdo con las reivindicaciones 1-16 en el que dicha célula se administra en una composición farmacéutica a una dosis de 10^4 a 10^9 células/kg peso corporal o de 10^5 a 10^6 células/kg peso corporal.
18. El linfocito T para utilizar de acuerdo con las reivindicaciones 1-17 en el que:
- 20 (i) la región de señalización coestimuladora 4-1BB comprende la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 23;
- (ii) el CAR comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de Sec. N°: 12;
- (iii) el scFv anti-CD19 está codificado por Id. de Sec. N°: 14;
- 25 (iv) la región de señalización 4-1BB puede estar codificada por Id. de Sec. N°: 17 y el dominio de señalización CD3 zeta está codificado por Id. de Sec. N°: 18;
- (v) el scFv anti-CD 19 está codificado por Id. de Sec. N°: 14, la región de señalización 4-1BB está codificada por Id. de Sec. N°: 17 y el dominio de señalización CD3 zeta está codificada por Id. de Sec. N°: 18; o
- 30 (vi) el CAR está codificado por la secuencia de ácido nucleico expuesta en Id. de Sec. N°: 8.

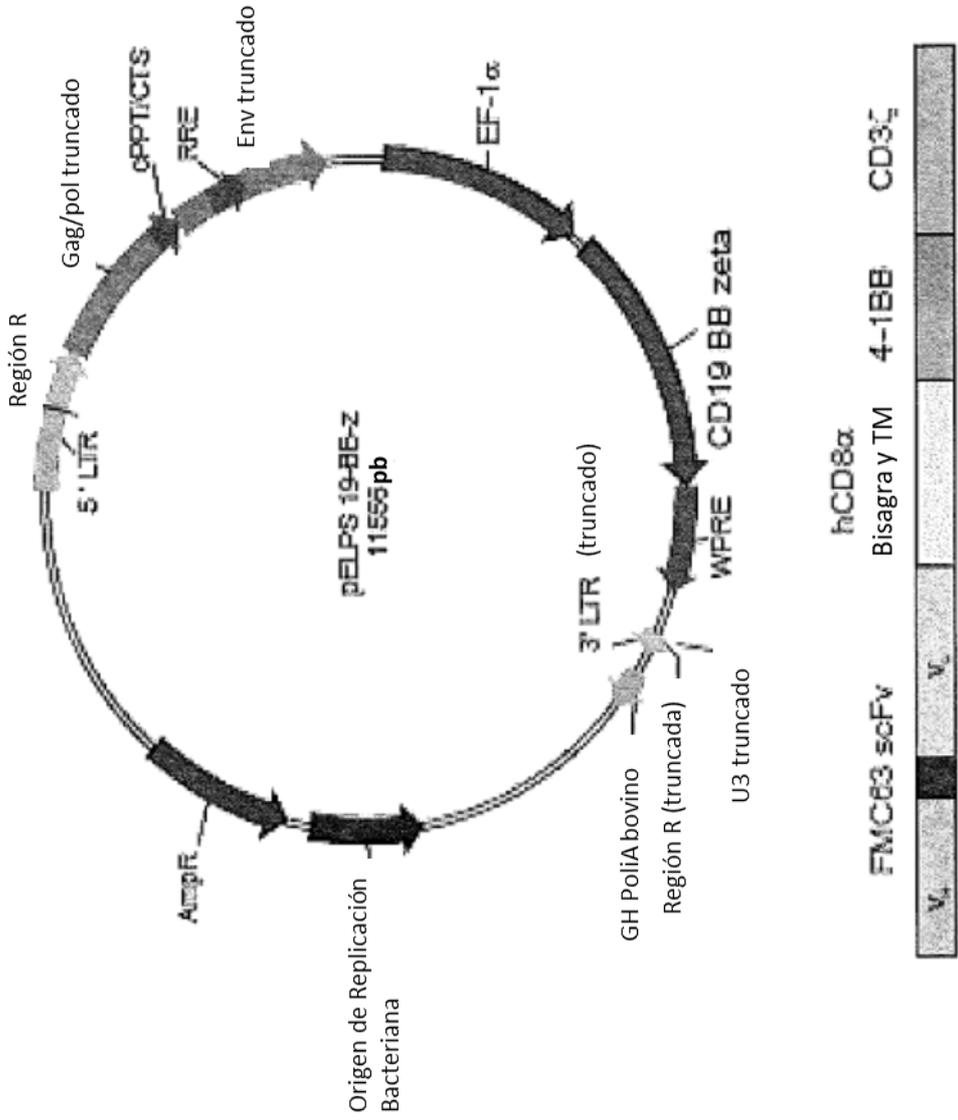


Figura 1A

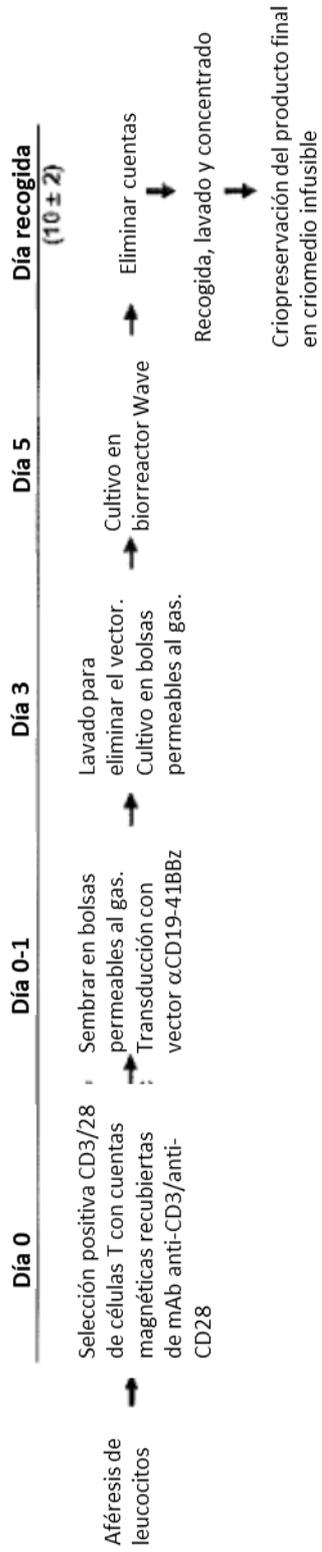


Figura 1B

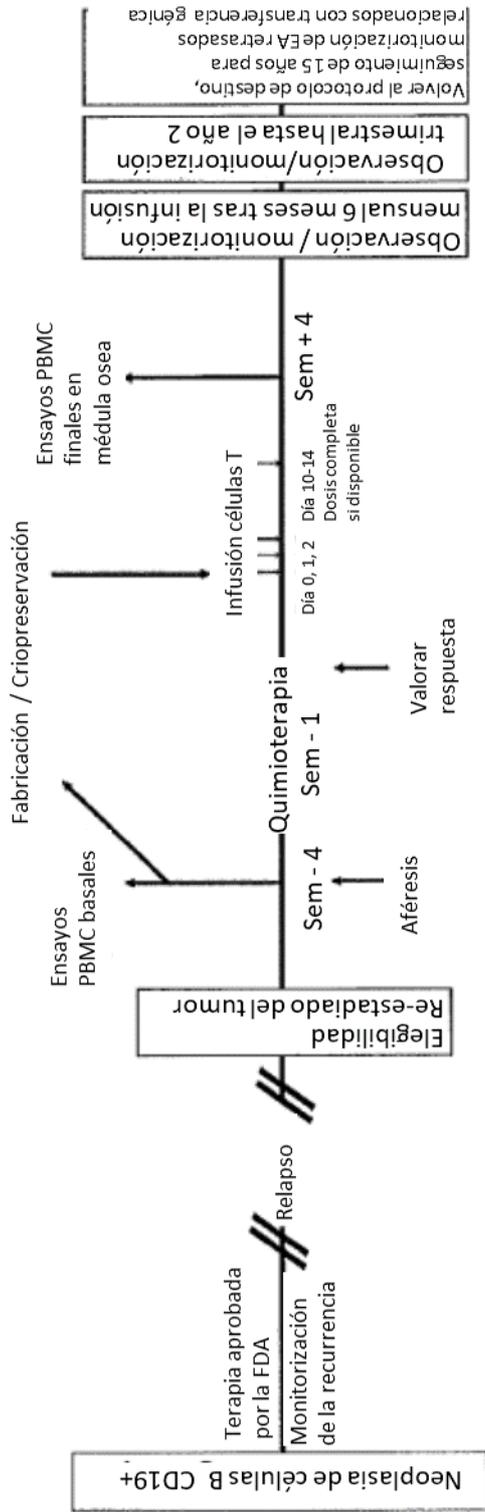
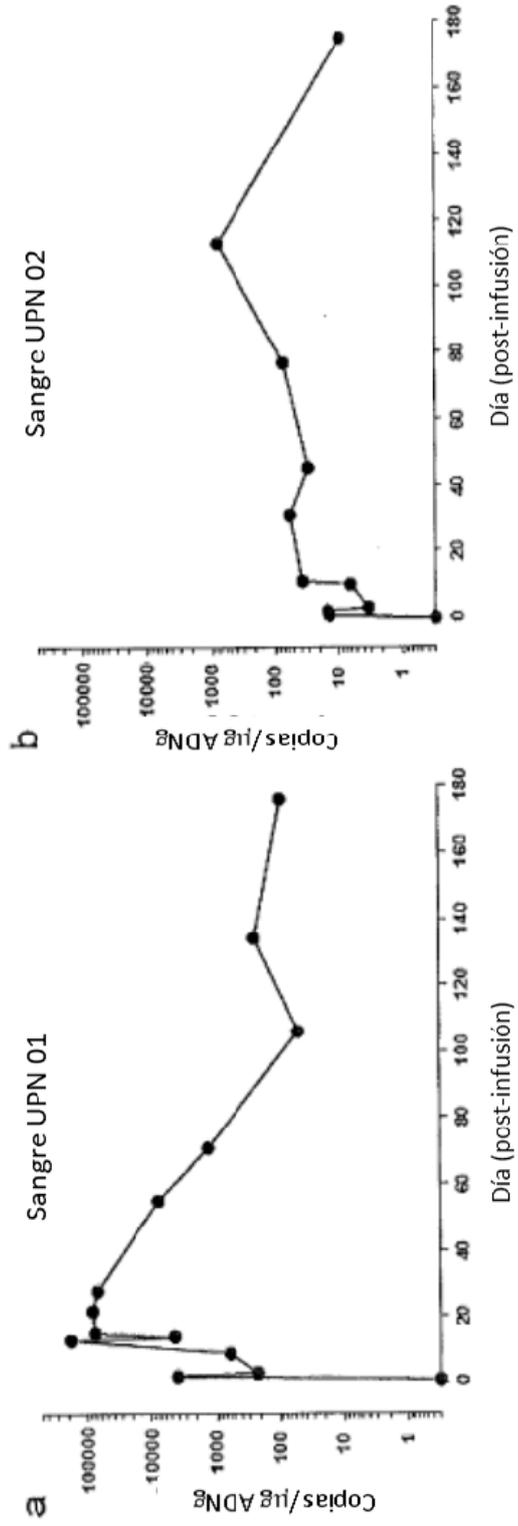
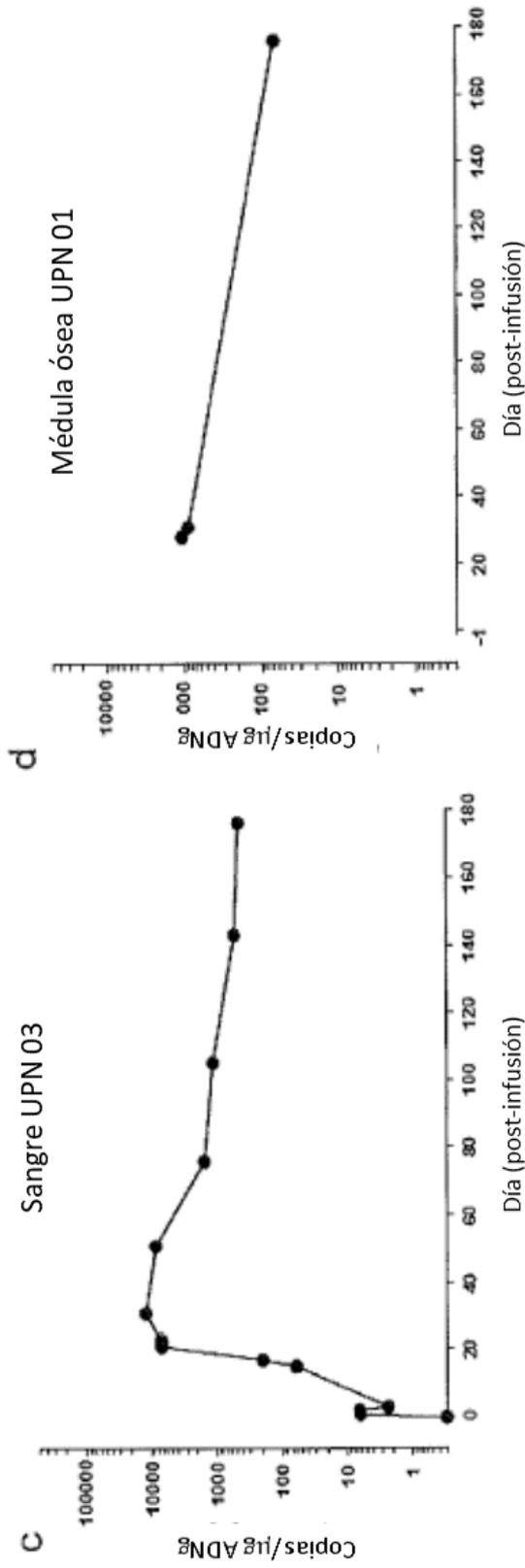


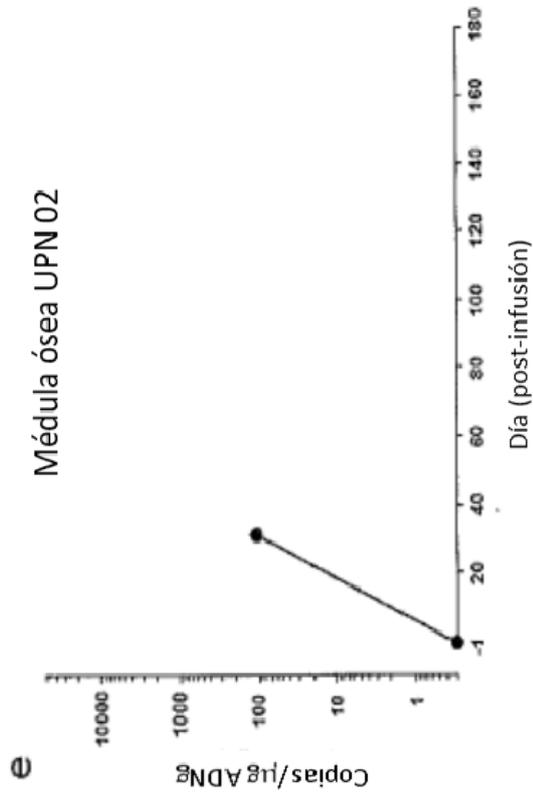
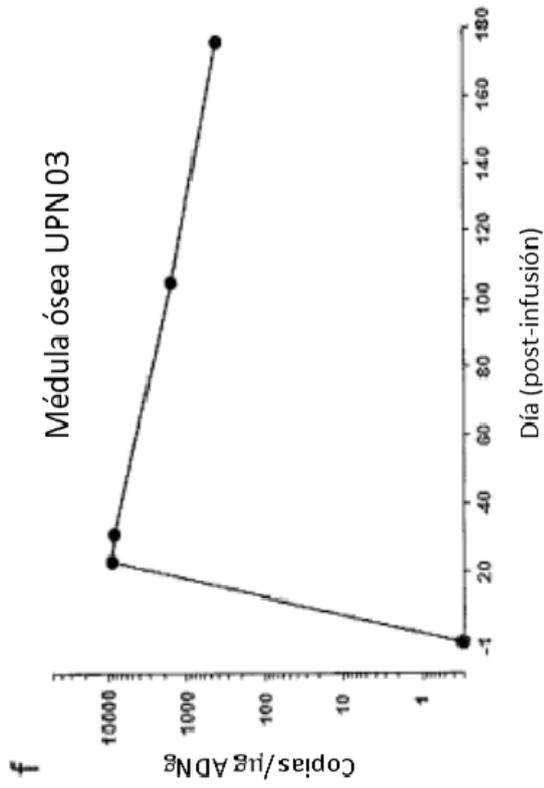
Figura 1C



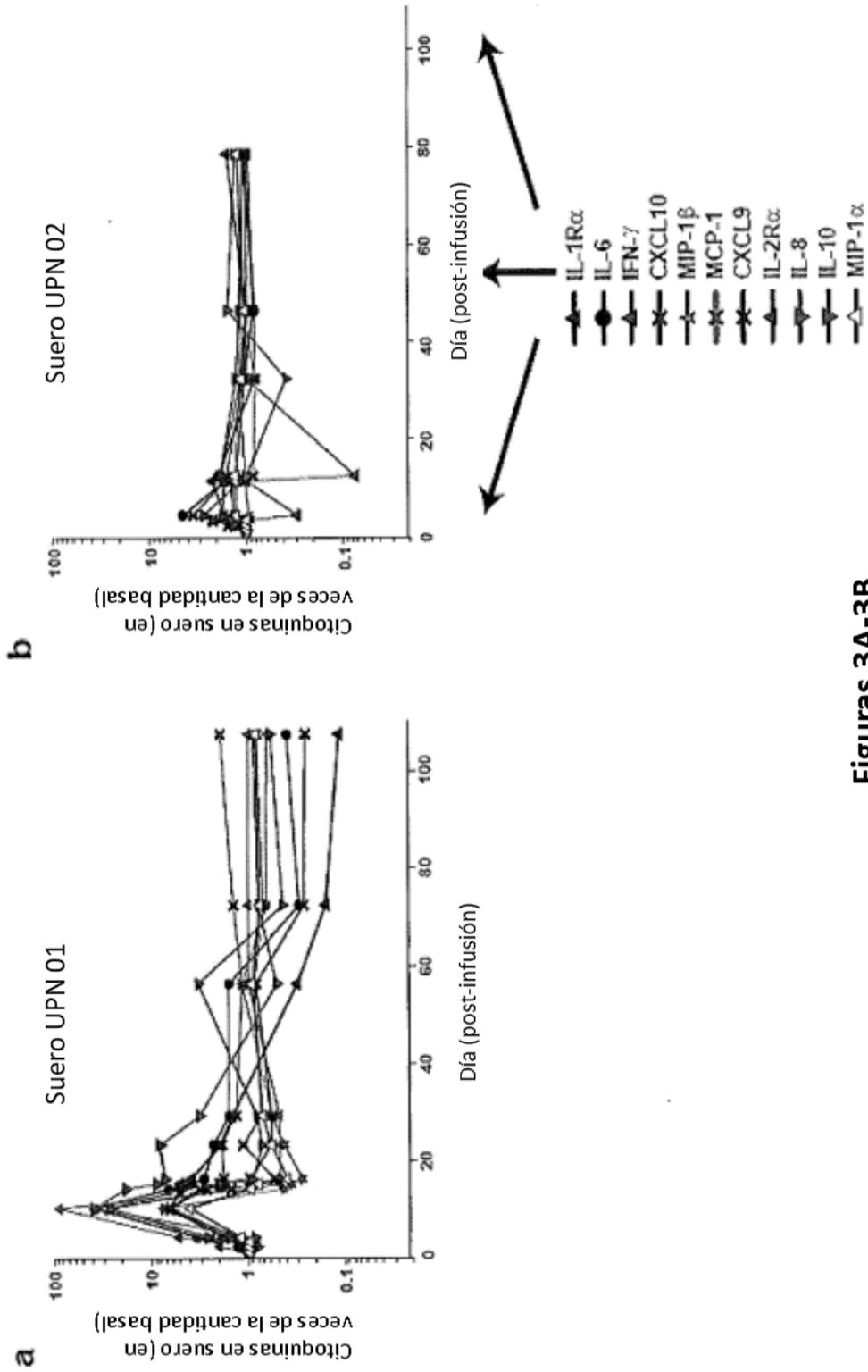
Figuras 2A-2B



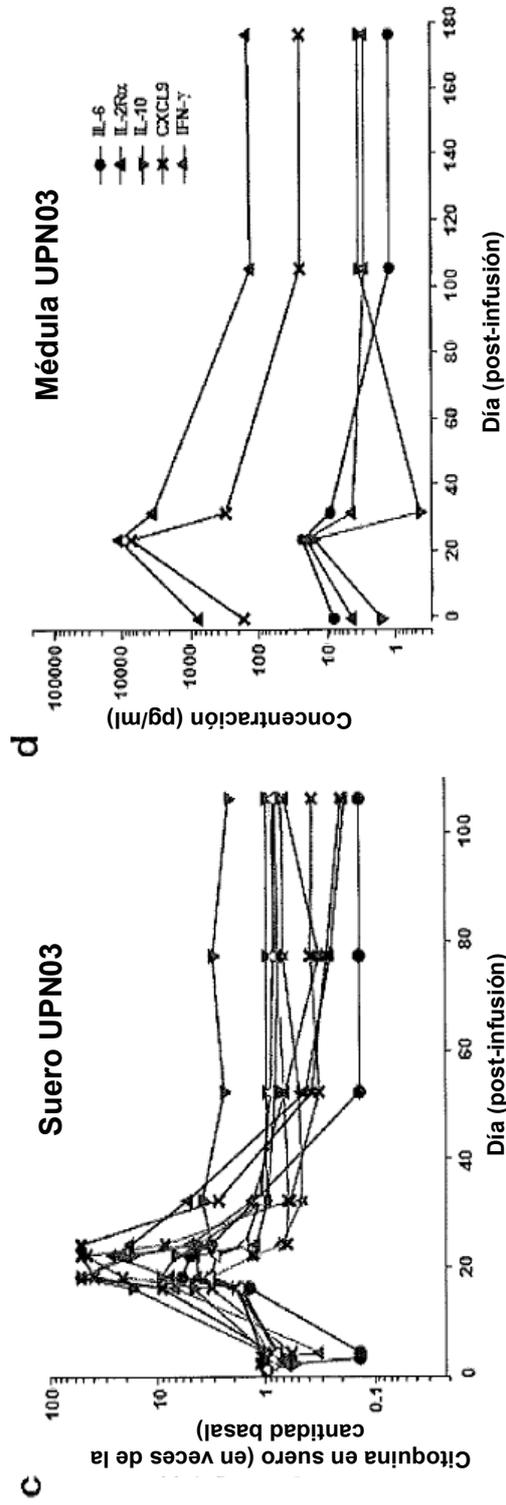
Figuras 2C-2D



Figuras 2E-2F



Figuras 3A-3B



Figuras 3C-3D

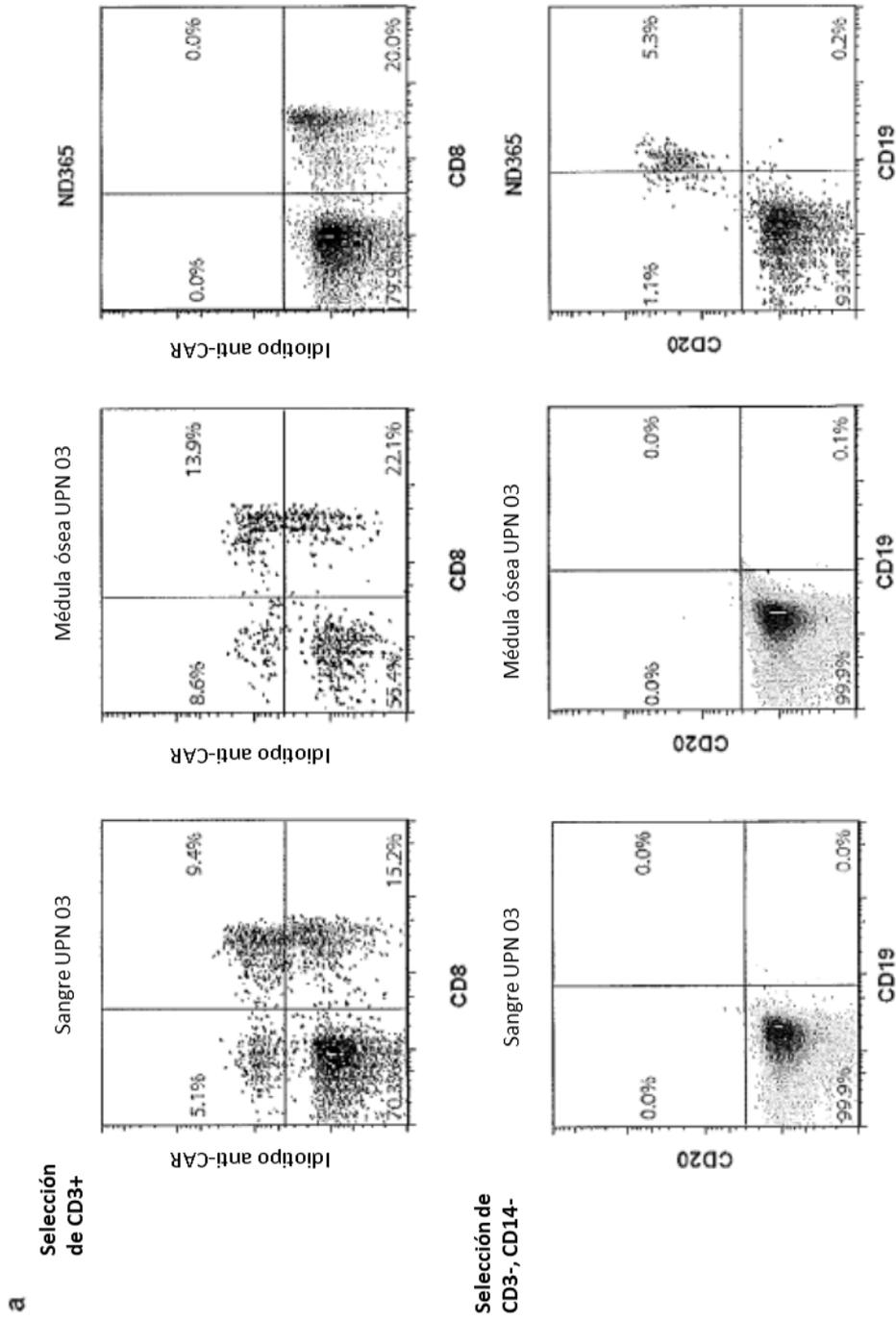


Figura 4A

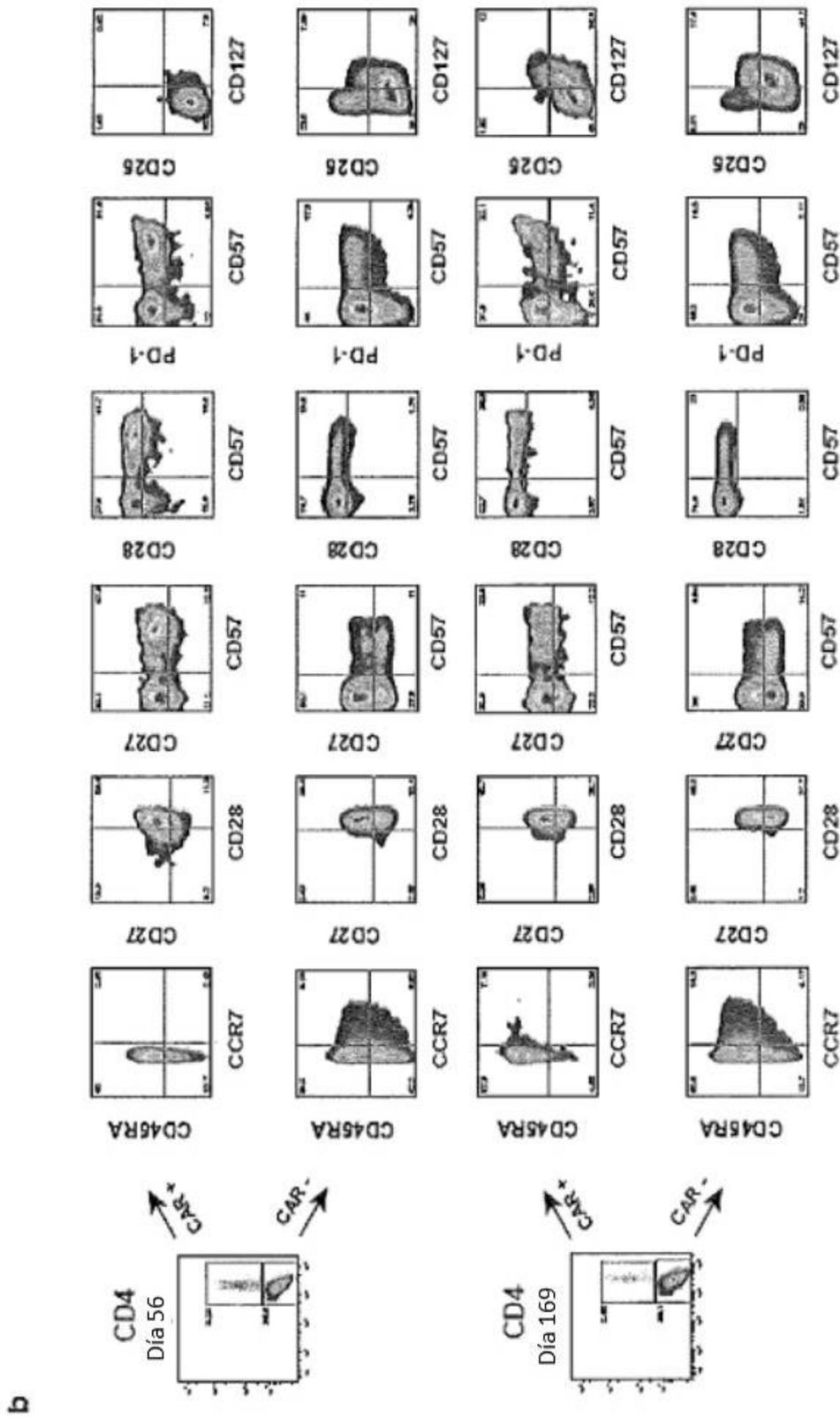


Figura 4B

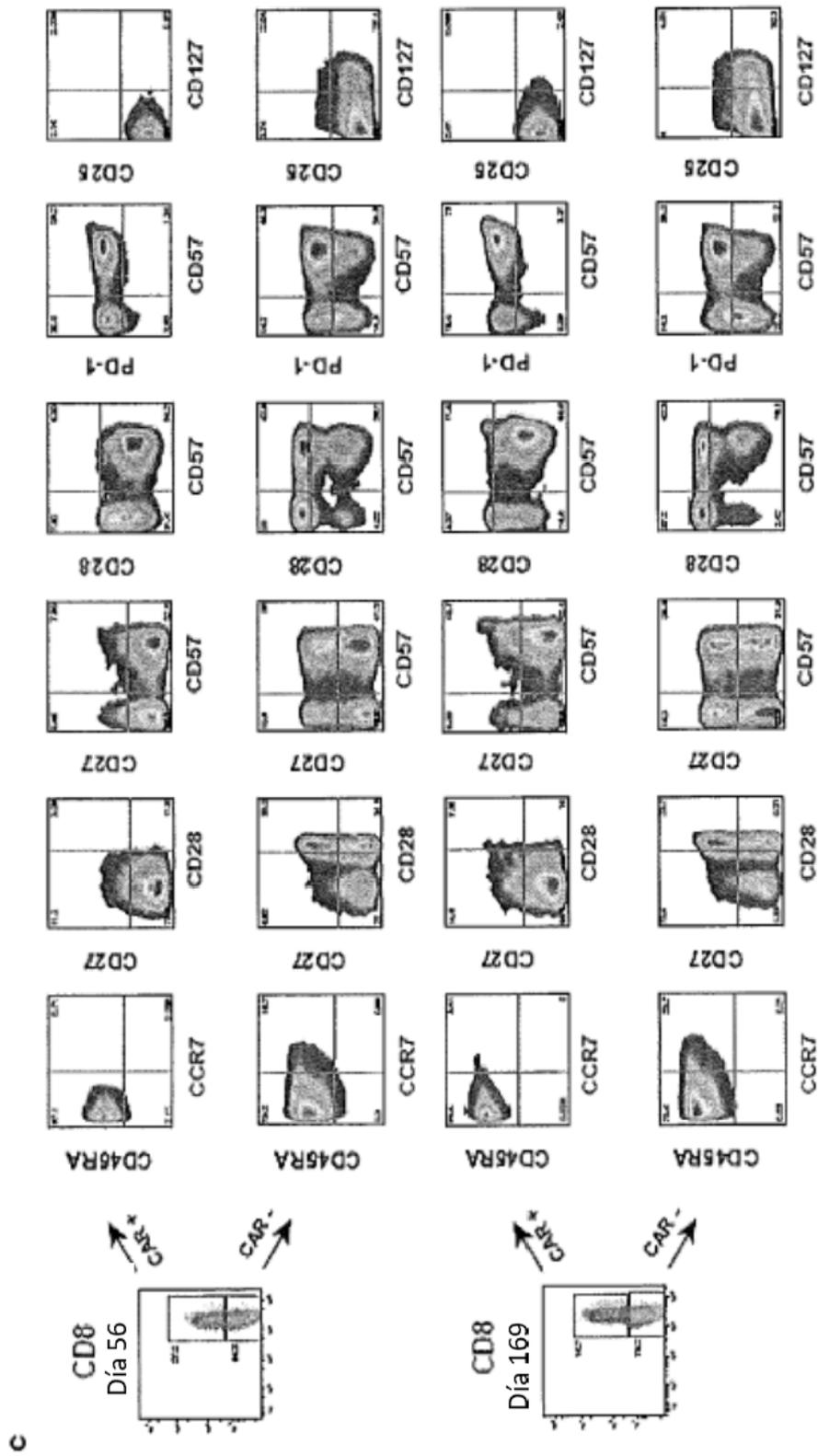


Figura 4C

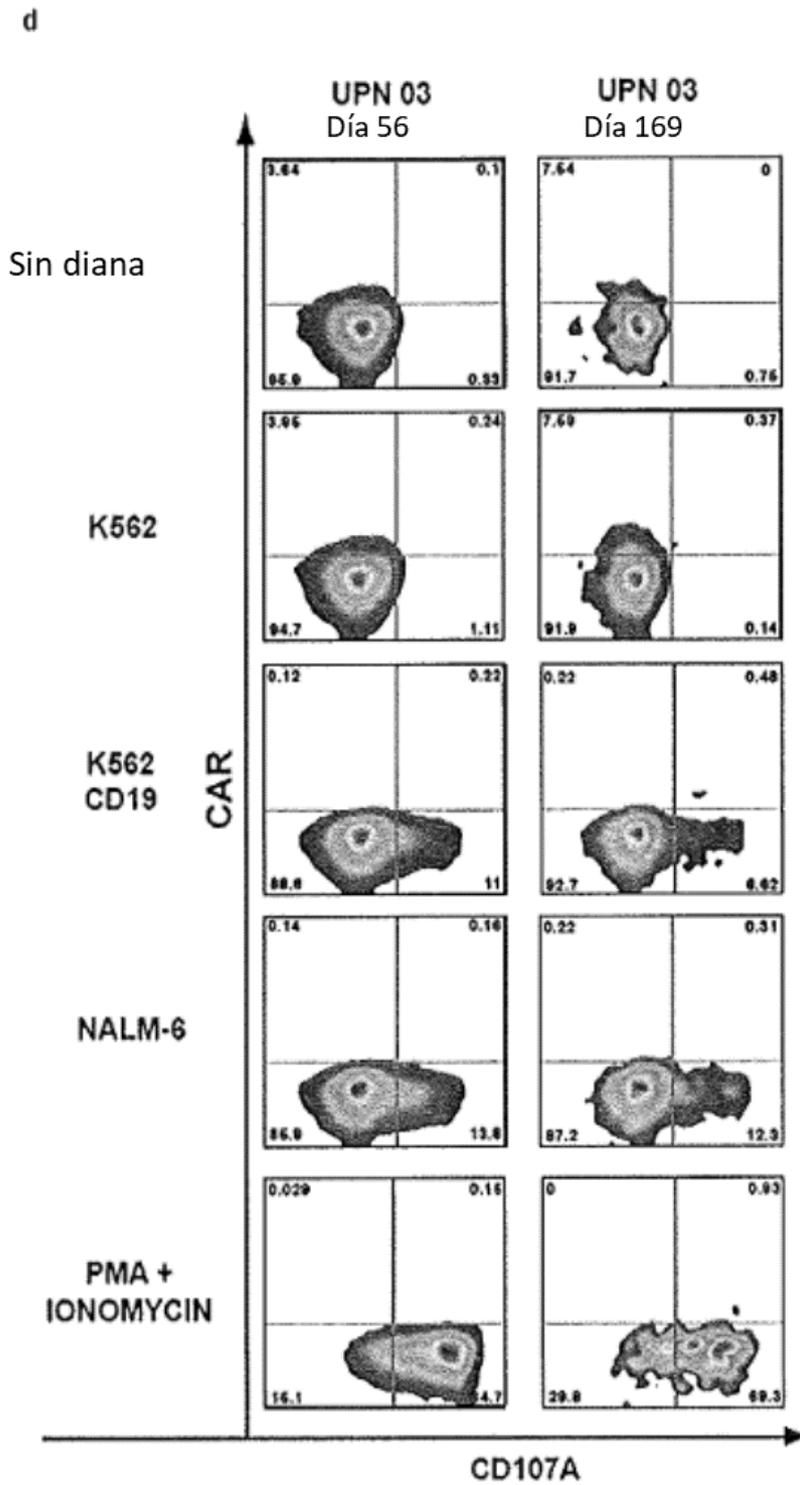


Figura 4D

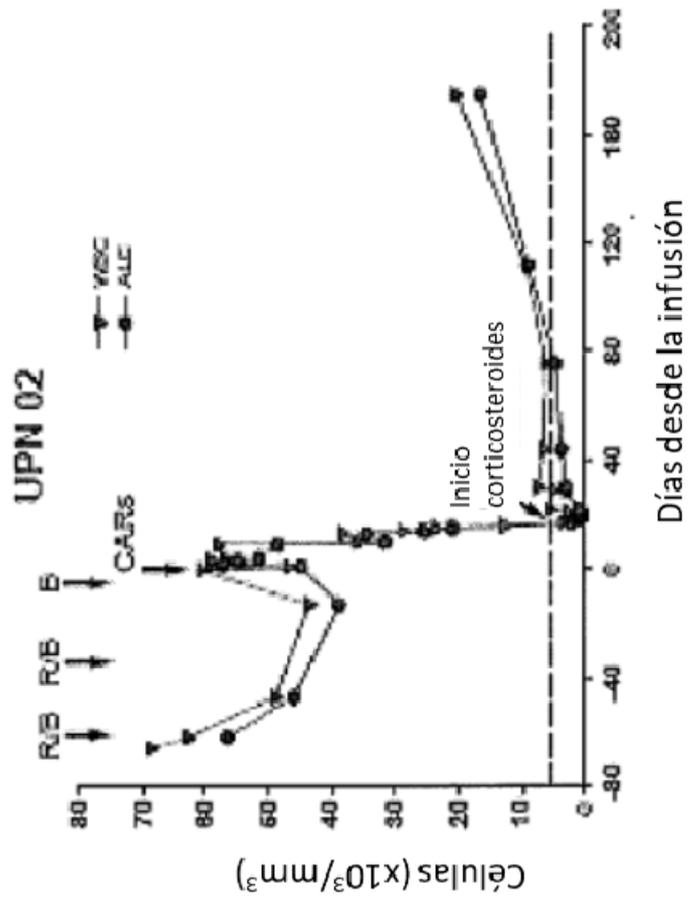


Figura 5A

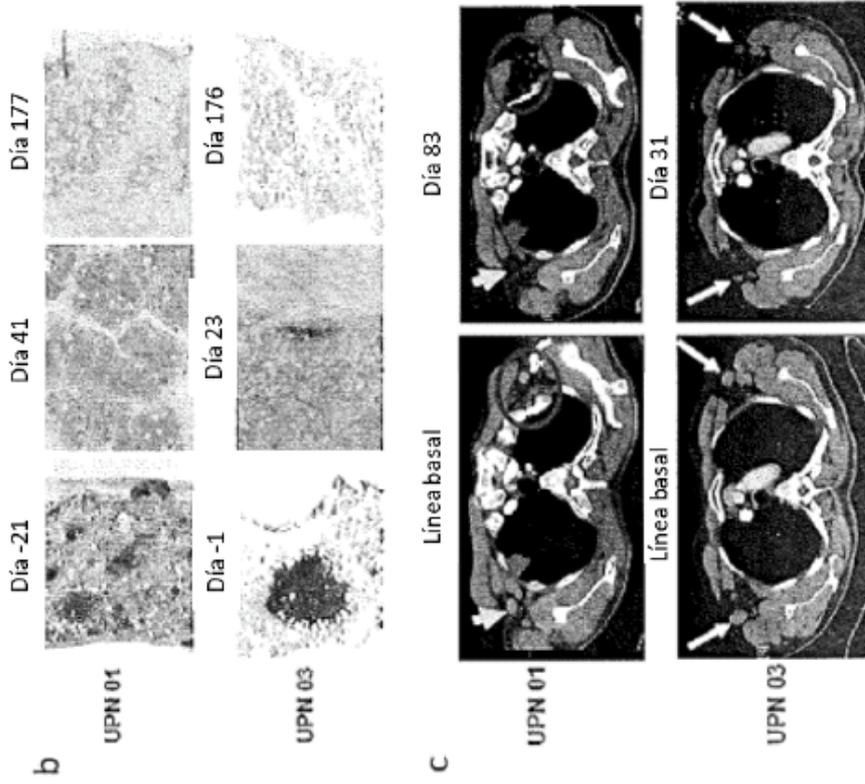


Figura 5B-5C

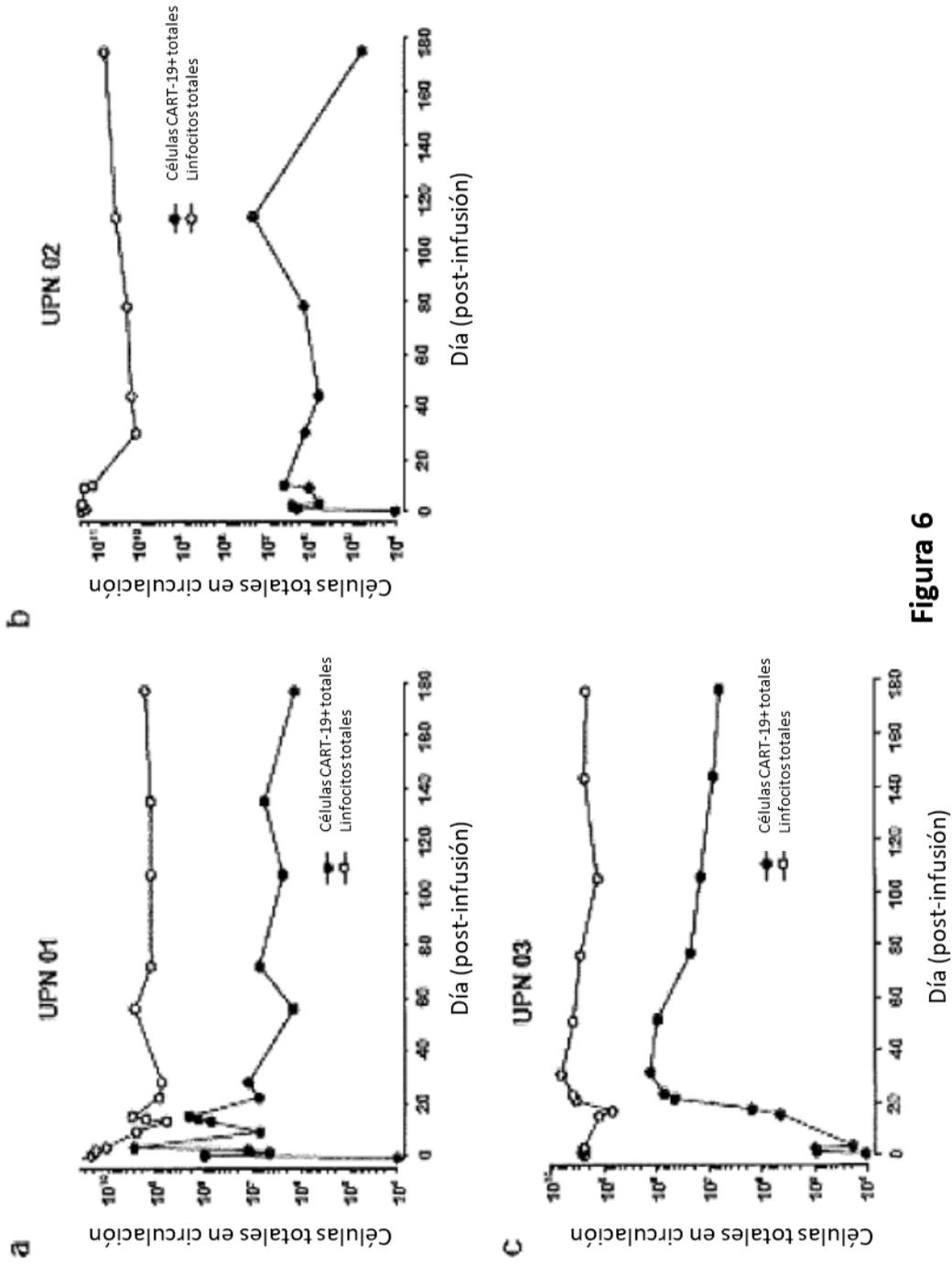


Figura 6

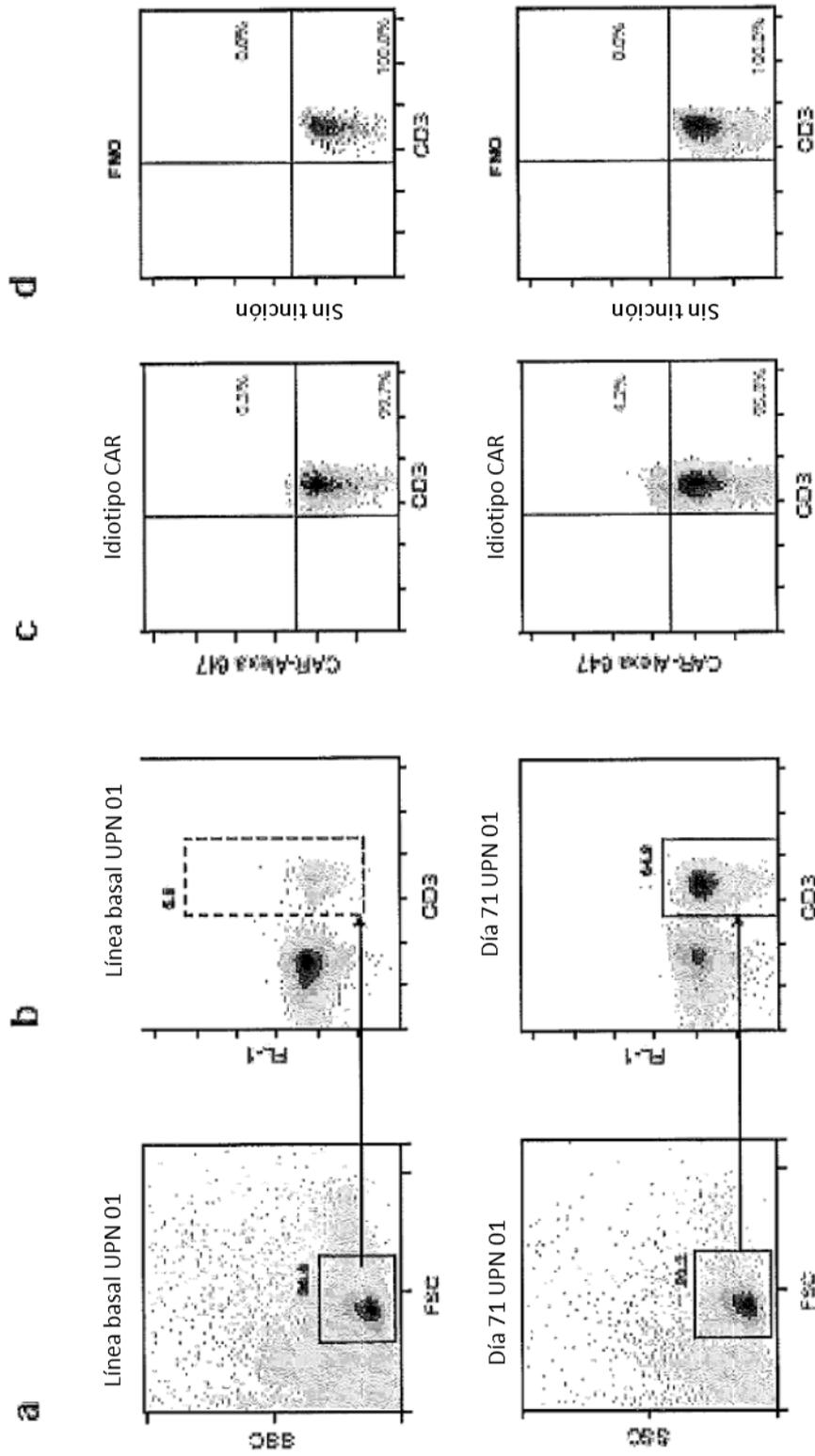


Figura 7

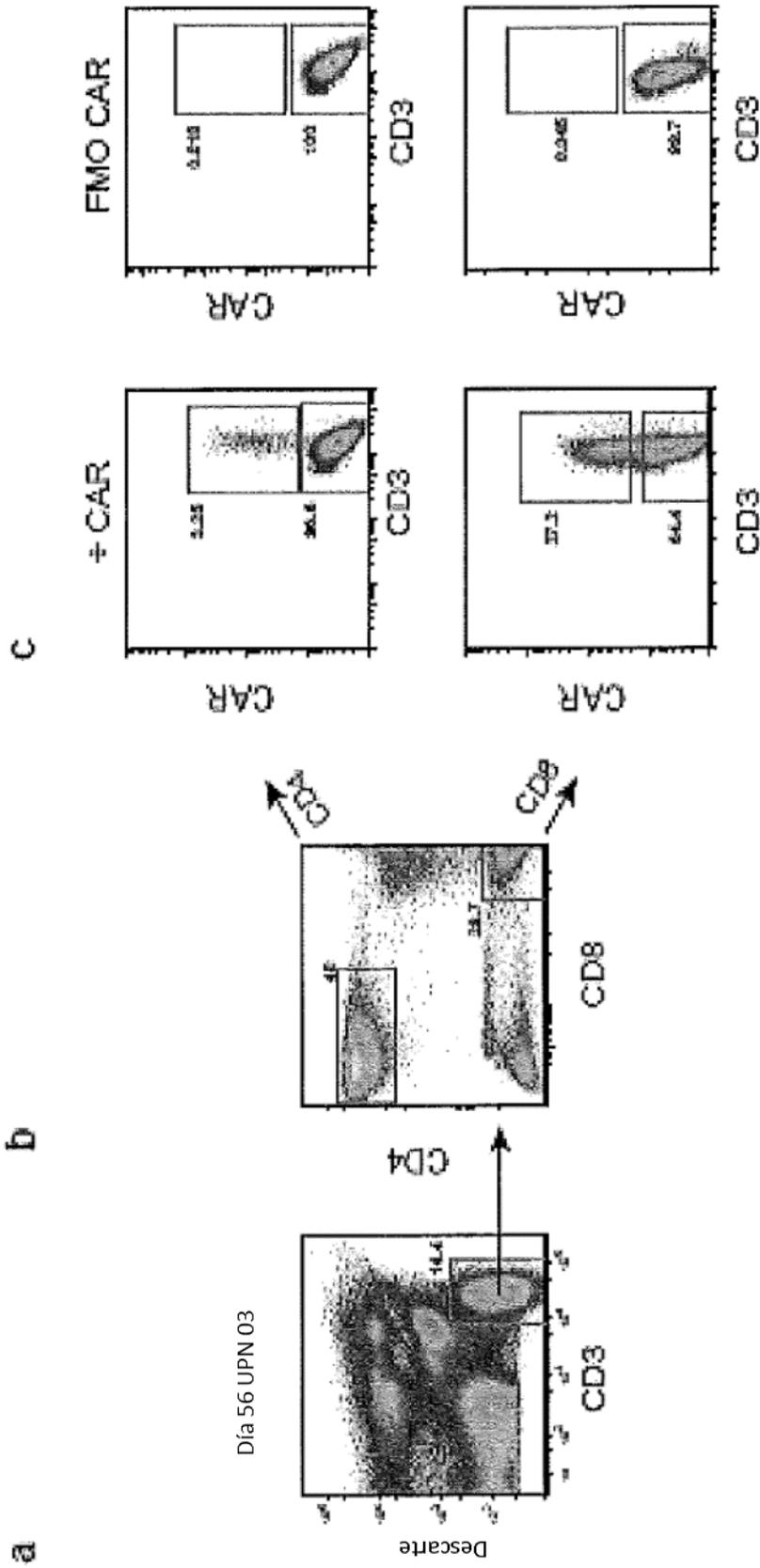


Figura 8

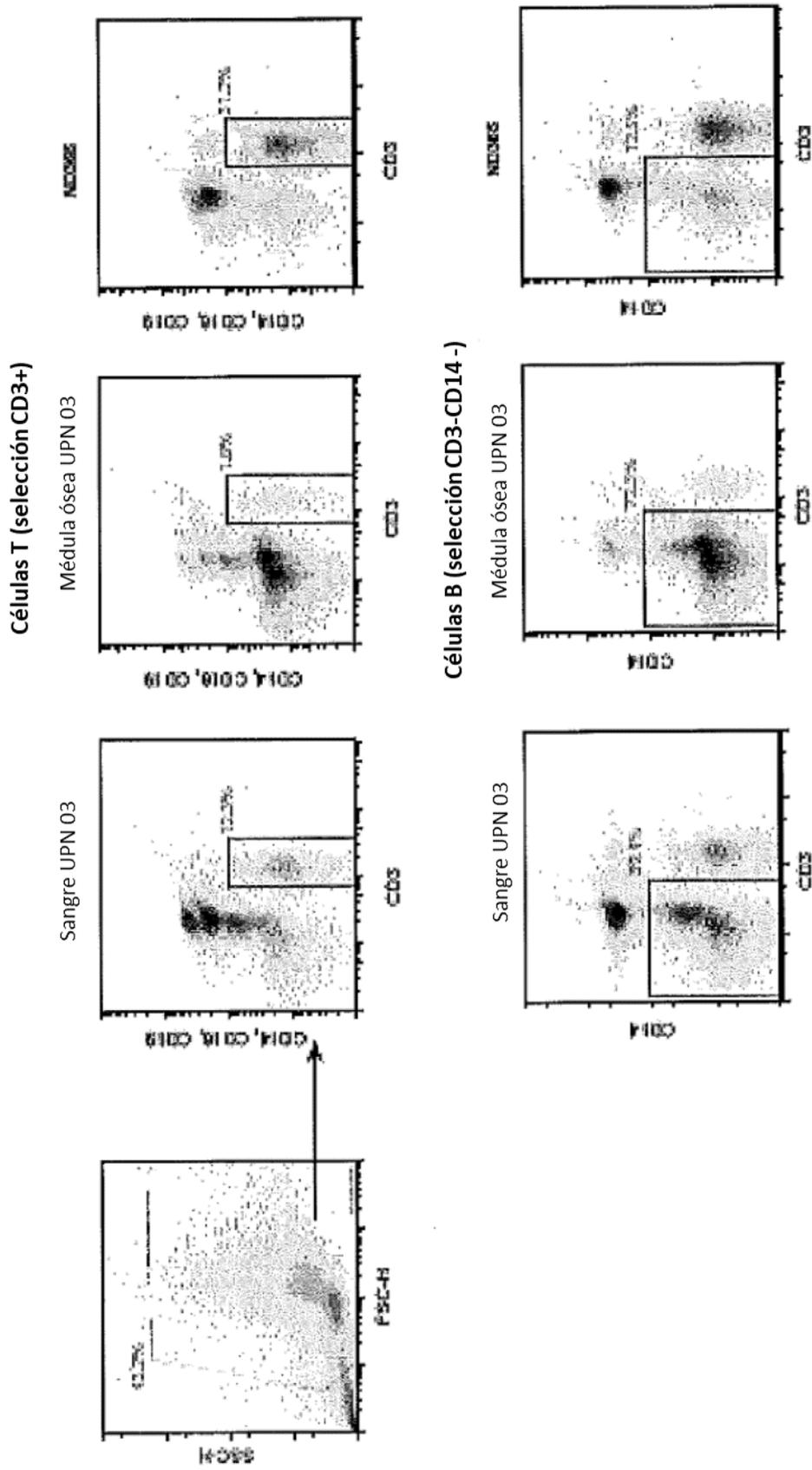


Figura 9

Sujeto UPN	Edad/sexo cariotipo	Terapia previa	Carga tumoral LLC en línea basal			Dosis total de CART19 (células/kg)	Respuesta D+30 (duración)
			Médula ósea ³ (día de estudio)	Sangre ³ (día de estudio)	Nódulos/bazo ³ (día de estudio)		
01	65/V normal	Fludarabine x4 ciclos (2002) Rituximab/Fludarabine x4 ciclos (2005) Alemtuzumab x 12 sem. (2005) Rituximab (2 ciclos 2008-2009) R-CVP x2 ciclos (2009) Lenalidomide (2009) PCR x2 ciclos (5/18-6/18/2010) Bendamustine x1 ciclo (7/31-8/1/10) pre-CART19	Hiper celular 70% LLC 2,4x10 ¹² células LLC (Día 14) 1,7x10 ¹² células LLC (Día 1)	N/A	Nódulos/bazo ³ 1,0x10 ¹² células LLC (Día 37)	1,1x10 ⁹ (1,5x10 ⁷ /kg)	CR (8+ meses)
02	77/V del(17)(p13) ¹	Alemtuzumab x 16 sem. (6/2007) Alemtuzumab x 18 sem. (3/2009) Bendamustine/Rituximab: 7/1/2010 (ciclo 1) 7/28/2010 (ciclo 2) 8/26/2010 (ciclo 3) pre-CART19	Hiper celular >95% LLC 3,2x10 ¹² células LLC (Día 47)	2,75x10 ¹¹ células LLC (Día 1)	1,2x10 ¹² – 2,0x10 ¹² células LLC (Día 24)	5,8x10 ⁸ (1x10 ⁷ /kg)	PR (5 meses)
03	64/V del(17)(p13) ²	R-Fludarabine x2 ciclos (2002) R-Fludarabine x4 ciclos (10/06-1/07) R-Bendamustine x1 ciclo (2/09) Bendamustine x3 ciclos (3-5/09) Alemtuzumab x11 semanas (12/09-3/10) Pentastin/ciclofosfamida (9/10/10) pre-CART19	Hiper celular 40% LLC 8,8x10 ¹¹ células LLC (Día 1)	N/A	3,3x10 ¹¹ – 5,5x10 ¹¹ células LLC (Día 10)	1,4x10 ⁷ (1,46x10 ⁶ /kg)	CR (7+ meses)

1: Cariotipo del UPN 02 (nomenclatura ISCN): 45,XY,del(1)(q25),+del(1)(p13),t(2:20)(p13;q11.2),t(3:5)(p13;q35),ad(9)(p22),?del(13)(q14q34),-14,del(17)(p13)[cp24]
 2: Cariotipo del UPN 03 (nomenclatura ISCN): 46,XY,del(17)(p12)[18]/44-46,idem,der(17)t(17:21)(p11.2;q11.2)[cp4]/40-45,XY,-17[cp3]
 3: Ver materiales suplementarios para los métodos de determinación de la carga tumoral

Figura 10

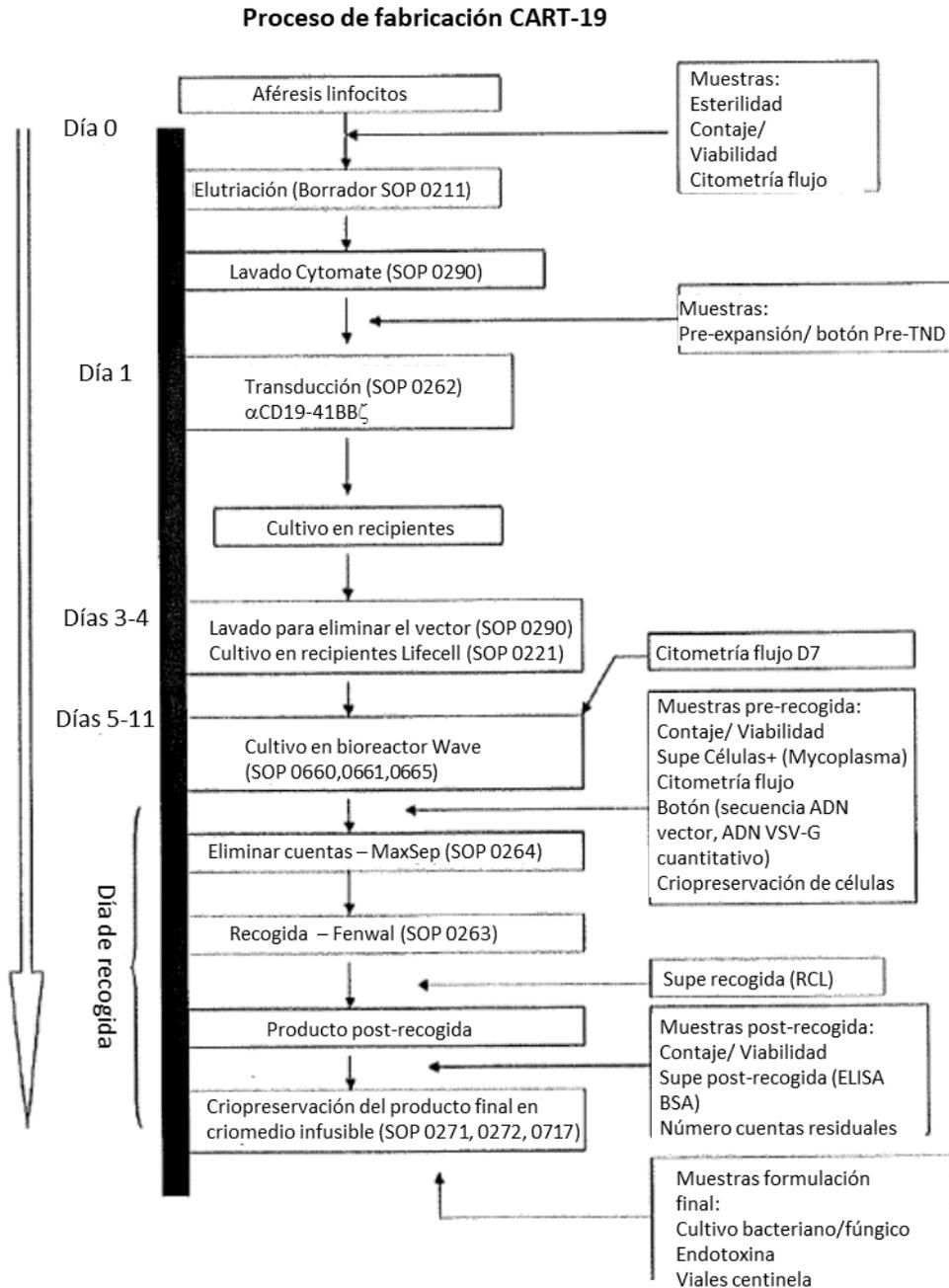
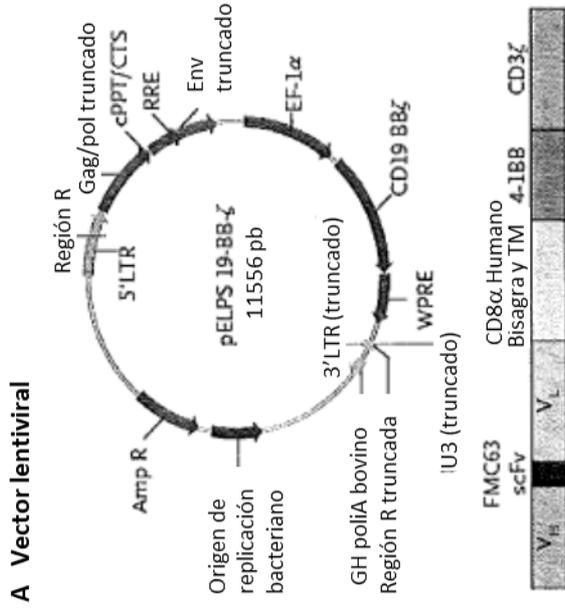
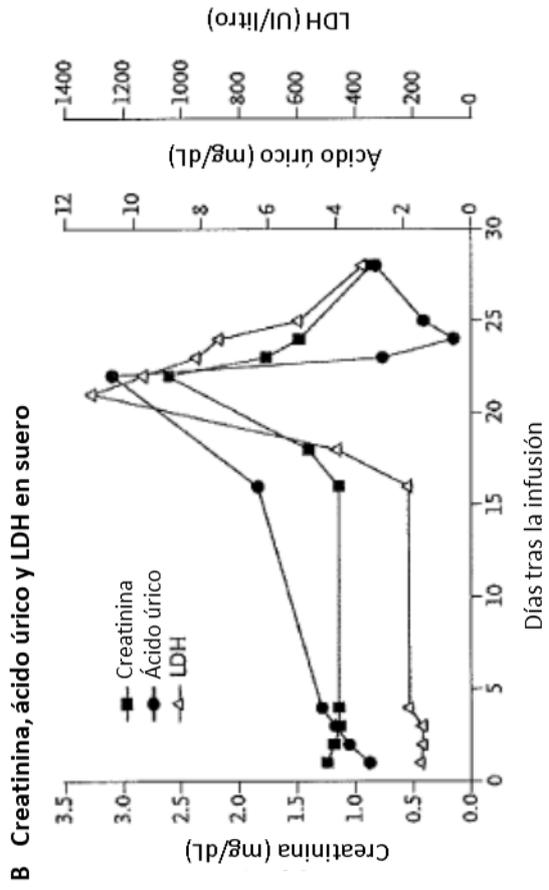
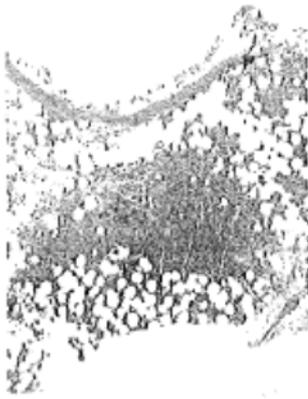


Figura 11

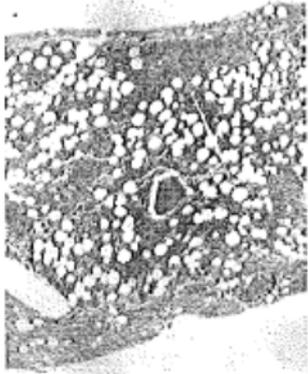


Figuras 12A-12B

C Especímenes biopsia de médula ósea
Día -1 (línea basal)



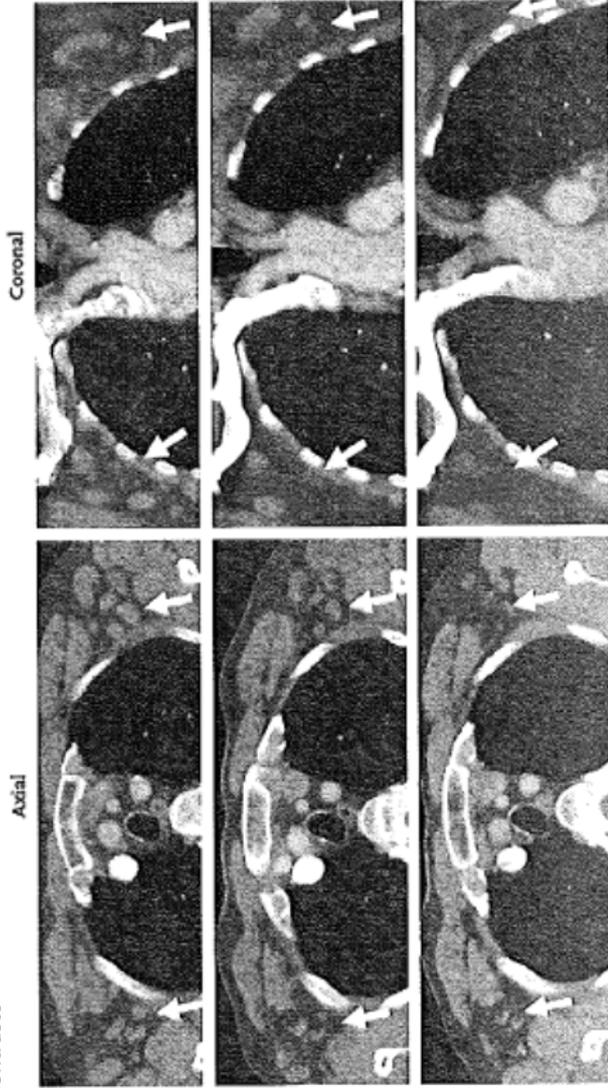
Día 23



6 Meses



D TC mejorada con contraste

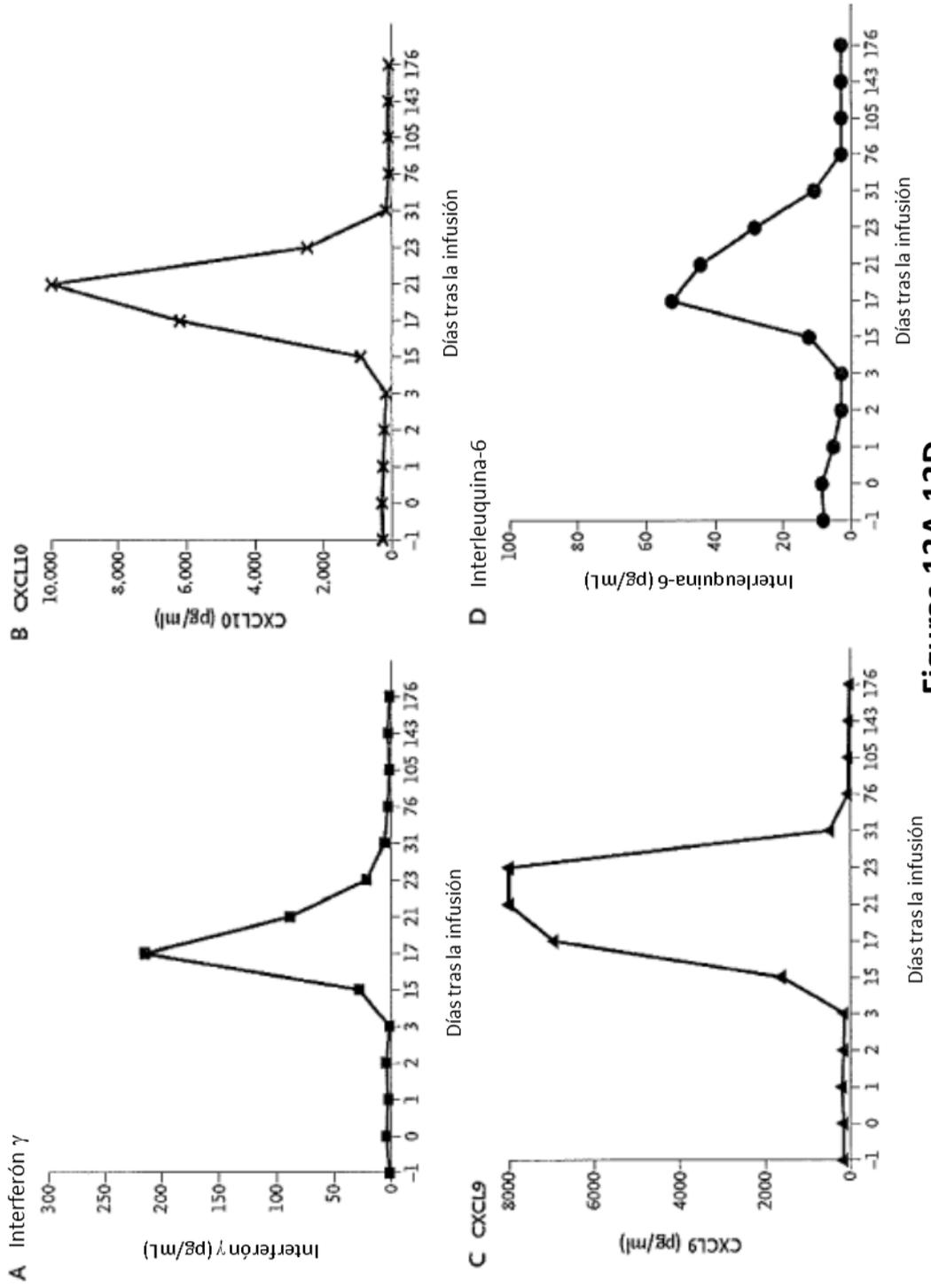


Antes de la terapia

1 mes de tratamiento

3 meses de tratamiento

Figuras 12C-12D



Figuras 13A-13D

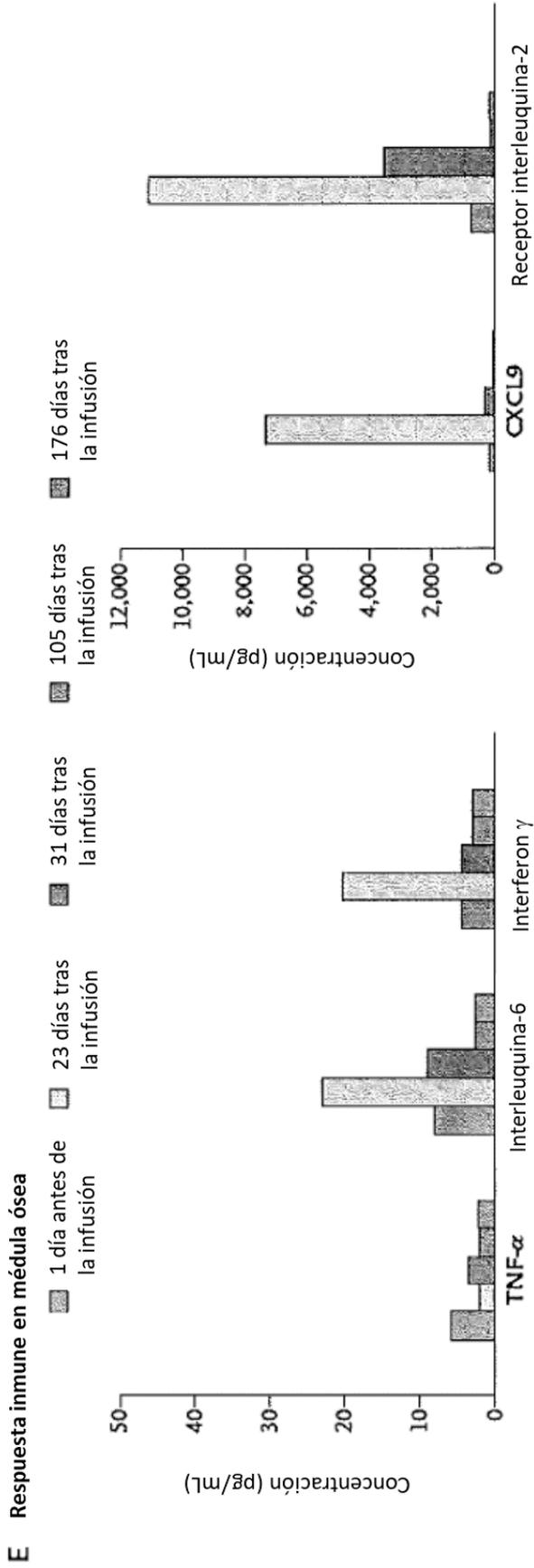
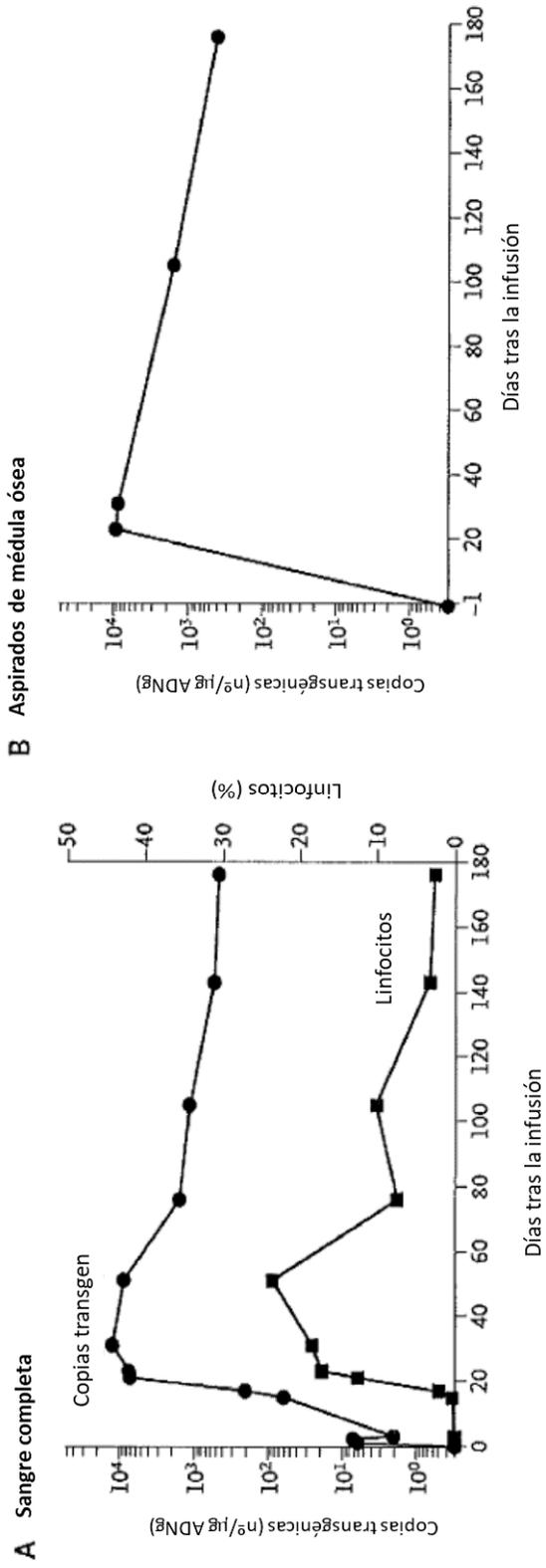


Figura 13E



Figuras 14A-14B

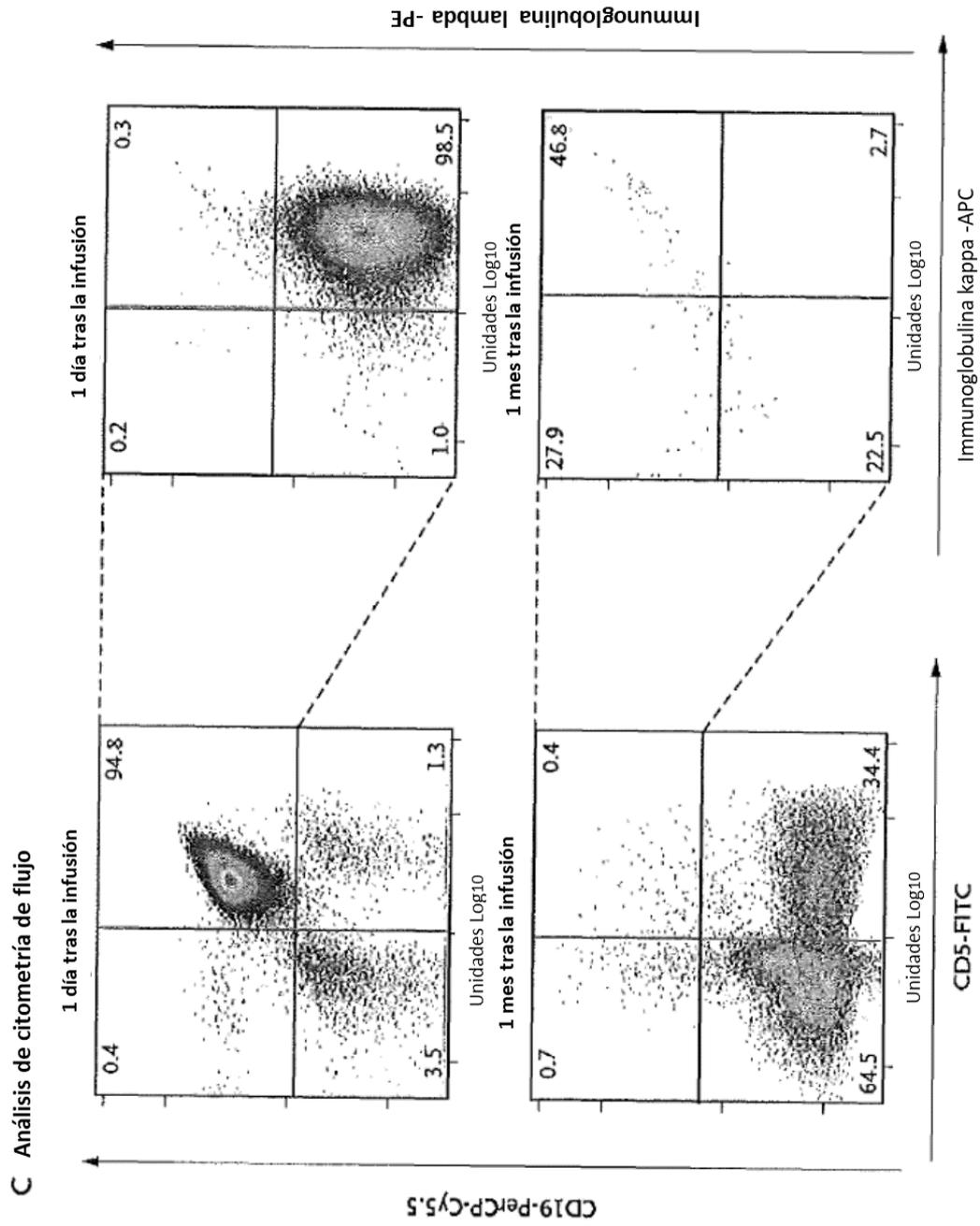


Figura 14C