

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 903**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**C12N 5/0783** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.09.2013 PCT/US2013/060332**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14065961**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2013 E 13773468 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019 EP 2912061**

54 Título: **Receptores de antígenos quiméricos M971**

30 Prioridad:

**24.10.2012 US 201261717960 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.07.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ORENTAS, RIMAS, J.;  
PASTAN, IRA, H.;  
DIMITROV, DIMITER, S. y  
MACKALL, CRYSTAL, L.**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI , Peter**

ES 2 718 903 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Receptores de antígenos quiméricos M971

5 **Declaración sobre la investigación y el desarrollo federalmente patrocinado**

Esta invención fue realizada con el apoyo del gobierno bajo el número de proyecto Z01 ZIA BC 010701 por los Institutos Nacionales de la Salud, Instituto Nacional del Cáncer. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

10 **Antecedentes de la invención**

El cáncer es un problema de salud pública. A pesar de los avances en tratamientos como la quimioterapia, el pronóstico para muchos cánceres, incluidas las malignidades hematológicas, puede ser malo. Por ejemplo, se estimó que se esperaban más de 45.000 muertes por linfoma no Hodgkin y leucemia en los Estados Unidos en 2000 (Greenlee et al., *CA Cancer J. Clin.*, 50:7-33 (2000)). Por consiguiente, existe una necesidad no satisfecha de tratamientos adicionales para el cáncer, particularmente las malignidades hematológicas. James SE et al., *The Journal of Immunology*, 180:7028 - 7038 (2008), desvela TCR quiméricos (cTCR, de sus siglas en inglés) específicos para un epítipo CD22 más distal a la membrana (RFB4, HD39) y los compara con un CAR específico para un epítipo CD22 más proximal a la membrana (Leu16) con respecto a la lisis de líneas celulares tumorales y de linfocitos B autólogos.

**Breve resumen de la invención**

El objeto de estudio de la invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas. Una realización de la invención proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR, de sus siglas en inglés) que se une específicamente a CD22, comprendiendo el CAR: un dominio de unión a antígeno que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 1, una CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 2, una CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 3, una CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 4, una CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 5, una CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 6, un dominio transmembrana y un dominio de señalización de linfocitos T intracelular.

35 Realizaciones adicionales de la invención proporcionan ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras y las composiciones farmacéuticas relacionados a los CAR de la invención para su uso en un método para tratar o prevenir el cáncer.

40 Realizaciones adicionales de la invención proporcionan los CAR, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células hospedadoras o las composiciones farmacéuticas de la invención para su uso en un método para tratar o prevenir el cáncer.

**Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos**

45 Las Figuras 1A-1G son: gráficas que muestran el % de lisis de las líneas celulares diana de leucemia REH (A), SEM (B), NALM6-GL (C), KOPN8 (D), Daudi (E), Raji (F) y K562 (G) marcadas con <sup>51</sup>Cr mediante linfocitos T humanos efectores que no se transdujeron (simulado, ●; círculos) o se transdujeron con los siguientes CAR: HA22-SH de segunda generación, versión 1 (▼), m971 de segunda generación, versión 1 (▲; triángulo abierto), o CAR específico de CD19 (■; cuadrados) en varias relaciones de efector a diana (E:D).

50 Las Figuras 2A-2C son gráficas que muestran el porcentaje de lisis de las líneas celulares diana de leucemia Raji (A), NALM6-GL (B) o K562 (C) mediante linfocitos T efectores no transducidos (simulado, ●; círculos;), m971-segunda generación, CAR versión 1 (▲), o CAR m971 de tercera generación (▼) en varias relaciones E:D.

55 Las Figuras 3A-3C son gráficas que muestran las cantidades de interferón (IFN)-γ (pg/ml) secretado por linfocitos T que no se transdujeron (simulado) o se transdujeron con uno de los siguientes CAR: anti-CD19, m971 de segunda generación versión 1 (SEQ ID NO: 23), m971 de tercera generación (SEQ ID NO: 24), HASH22 de segunda generación versión 1, HASH22 de segunda generación versión 2, o HASH22 de tercera generación después de un cultivo conjunto con líneas celulares de leucemia NALM6-GL (CD22<sup>bajo</sup>) (A), Raji (CD22<sup>alto</sup>) (B) o K562 (CD22 negativo) (C).

65 Las Figuras 3D-3F son gráficas que muestran las cantidades de interleucina (IL)-2 (pg/ml) secretada por linfocitos T que no se transdujeron (simulado) o se transdujeron con uno de los siguientes CAR: anti-CD19, m971 de segunda generación versión 1 (SEQ ID NO: 23), m971 de tercera generación (SEQ ID NO: 24), HASH22 de segunda generación versión 1, HASH22 de segunda generación versión 2, o HASH22 de tercera generación después de un cultivo conjunto con líneas celulares de leucemia NALM6-GL (CD22<sup>bajo</sup>) (A), Raji (CD22<sup>alto</sup>) (B) o K562 (CD22

negativo) (C).

Las Figuras 3G-3I son gráficas que muestran las cantidades de factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  (pg/ml) secretado por linfocitos T que no se transdujeron (simulado) o se transdujeron con uno de los siguientes CAR: anti-CD19, m971 de segunda generación versión 1 (SEQ ID NO: 23), m971 de tercera generación (SEQ ID NO: 24), HASH22 de segunda generación versión 1, HASH22 de segunda generación versión 2, o HASFI22 de tercera generación después de un cultivo conjunto con líneas celulares de leucemia NALM6-GL (CD22<sup>bajo</sup>) (A), Raji (CD22<sup>alto</sup>) (B) o K562 (CD22 negativo) (C).

La Figura 4A es una gráfica que muestra señales bioluminiscentes (fotones/s/cm<sup>2</sup>/sr) generadas por la reacción de luciferasa (transfectada en células de leucemia, que se inyectaron en ratones) con luciferina que se inyectó en los ratones, medidas durante un período de tiempo de 30 días. Los ratones se trataron con linfocitos T de control ("simulado", no transducidos, ●; círculos) o linfocitos T transducidos con el CAR HASH22 de segunda generación, versión 1 (■; cuadrados) o m971 de segunda generación versión 1 (triángulos, SEQ ID NO: 23). Los valores más altos de fotones/s/cm<sup>2</sup>/sr indican una mayor carga tumoral.

La Figura 4B es una gráfica que muestra el porcentaje de supervivencia de los ratones tratados con linfocitos T de control ("simulado", no traducidos, cuadrados) o linfocitos T transducidos con el CAR MASH22 de segunda generación versión 1 (círculos) o el CAR 971 de segunda generación versión 1 (triángulos, SEQ ID NO: 23) durante 30 días. (Simulado v. HA22, p = 0,0019; simulado v. m971, p = 0,0019; m971 v. HA22, p = 0,003).

La Figura 5 es una tabla que muestra imágenes bioluminiscentes de ratones con leucemia tres, cinco y ocho días después del tratamiento con linfocitos T no transducidos (simulado) o 15 x 10<sup>6</sup>, 5 x 10<sup>6</sup>, 1 x 10<sup>6</sup>, o 1 x 10<sup>5</sup> linfocitos T que se transdujeron con una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR m971 de segunda generación, versión 2 (SEQ ID NO: 22). Un cambio en el sombreado de gris a blanco indica una mayor carga tumoral.

La Figura 6 es una gráfica que muestra el número total de fotones emitidos en la bioluminiscencia de los ratones mostrados en la Figura 5 durante un período de 44 días. El número total de fotones se cuantificó y trazó, y se muestran los promedios y las desviaciones estándar para cada punto temporal. Los ratones se trataron con linfocitos T no transducidos (simulado) (signo más) o 15 x 10<sup>6</sup> (diamante), 5 x 10<sup>6</sup> (flor), 1 x 10<sup>6</sup> (cruz) o 1 x 10<sup>5</sup> (asterisco) linfocitos T que se transdujeron con una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR m971 de segunda generación, versión 2 (SEQ ID NO: 22).

### Descripción detallada de la invención

El objeto de estudio de la invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas. Una realización de la invención proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR, de sus siglas en inglés) que se une específicamente a CD22, comprendiendo el CAR: un dominio de unión a antígeno que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 1, una CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 2, una CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 3, una CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 4, una CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 5, una CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 6, un dominio transmembrana y un dominio de señalización de linfocitos T intracelular.

Un CAR es una proteína o polipéptido híbrido construido artificialmente que contiene los dominios de unión a antígeno de un anticuerpo (por ejemplo, un fragmento variable de cadena única (scFv)) unido a los dominios de señalización de linfocitos T. Las características de los CAR incluyen su capacidad para redirigir la especificidad y la reactividad de los linfocitos T hacia una diana seleccionada de una manera no restringida por MHC, explotando las propiedades de unión a antígeno de los anticuerpos monoclonales. El reconocimiento de antígeno no restringido por MHC da a los linfocitos T, que expresan CAR, la capacidad para reconocer el antígeno independientemente del procesamiento del antígeno, evitando así un importante mecanismo de resistencia tumoral. Además, cuando se expresan en linfocitos T, los CAR ventajosamente no dimerizan con las cadenas alfa y beta de receptores de linfocitos T endógenos (TCR, de sus siglas en inglés).

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

Los CAR de la invención tienen especificidad de antígeno para CD22. CD22 es un antígeno de linfocitos B con restricción de linaje que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig). CD22 se expresa en el 60-70 % de los linfomas de linfocitos B y leucemias (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica B, tricoleucemia, leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de Burkitt) y no está presente en la superficie celular en etapas tempranas del desarrollo de linfocitos B o en células madre. Vaickus et al., *Crit. Rev. Oncol./Hematol.*, 11:267-297 (1991); Bang: et al., *Clin. Cancer Res.*, 11:1545-50 (2005).

5 Sin estar vinculado a una teoría o mecanismo particular, se cree que mediante la provocación de una respuesta específica de antígeno contra CD22, los CAR inventivos proporcionan uno o más de cualquiera de los siguientes: direccionamiento y destrucción de células cancerosas que expresan CD22, reducción o eliminación de células cancerosas, facilitación de la infiltración de células inmunitarias en el (los) sitio(s) del tumor, y mejora/extensión de las respuestas contra el cáncer. Debido a que CD22 no se expresa en las etapas tempranas del desarrollo de linfocitos B o en células madre, se contempla que los CAR inventivos eviten ventajosamente dirigirse/destruir substancialmente células madre y/o linfocitos B en las etapas tempranas del desarrollo.

10 Una realización de la invención proporciona un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno del anticuerpo m971 ("m971"). El dominio de unión a antígeno de m971 se une específicamente a CD22. A este respecto, una realización preferida de la invención proporciona un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno que comprende, que consiste en, o que consiste esencialmente en, un fragmento variable de cadena única (scFv) del dominio de unión a antígeno de m971. El anticuerpo m971 proporciona una unión mejorada a CD22 en comparación con la inmunotoxina HA22 y también se une a un epítipo CD22 diferente, (Xiao et al., *mAbs* 1:3, 297-303 (2009) y el documento WO 2009/124109 A1

20 El dominio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 1, una CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 2, una CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 3, una CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 4, una CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 5, una CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 6.

25 La región variable de cadena ligera del dominio de unión a antígeno puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, la SEQ ID NO 7. La región variable de cadena pesada del dominio de unión a antígeno puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, la SEQ ID NO 8. Por consiguiente, en una realización de la invención, el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 7 y/o una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 8. Preferentemente, el dominio de unión a antígeno comprende ambas SEQ ID NO: 7 y 8.

30 En una realización de la invención, la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada pueden unirse mediante un conector. El conector puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos adecuada. En una realización de la invención, el conector puede comprender, consistir, o consistir esencialmente en, la SEQ ID NO 11.

40 En una realización, el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada. A este respecto, una realización del dominio de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada comprende, consiste en, o consiste esencialmente en, la SEQ ID NO 9.

45 En una realización, el dominio de unión a antígeno comprende una secuencia líder. La secuencia líder puede colocarse en el extremo amino de la región variable de cadena ligera. La secuencia líder puede comprender cualquier secuencia líder adecuada. En una realización, la secuencia líder es una secuencia del receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, de sus siglas en inglés). A este respecto, el dominio de unión a antígeno comprende una secuencia líder que comprende, que consiste en, o que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 10. En una realización de la invención, si bien la secuencia líder puede facilitar la expresión del CAR en la superficie de la célula, la presencia de la secuencia líder en un CAR expresado no es necesaria para que el CAR funcione. En una realización de la invención, tras la expresión del CAR en la superficie celular, la secuencia líder puede escindir del CAR. Por consiguiente, en una realización de la invención, el CAR carece de una secuencia líder.

50 En una realización de la invención, el CAR comprende un dominio transmembrana. En una realización de la invención, el dominio transmembrana comprende i) CD8 y/o ii) CD28. En una realización preferida, el CD8 y el CD28 son humanos. El CD8 o el CD28 puede comprender menos que el CD8 o el CD28 completo, respectivamente. A este respecto, el CAR comprende un dominio transmembrana de CD8 que comprende, que consiste en, o que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 12 o 18 y/o un dominio transmembrana de CD28 que comprende, que consiste en, o que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 15.

60 En una realización de la invención, el CAR comprende un dominio de señalización de linfocitos T intracelular que comprende uno o más de i) CD28, ii) CD137, y/o iii) CD3 zeta ( $\zeta$ ). En una realización preferida, el CD28, CD137 y CD3 zeta son humanos. CD28 es un marcador de linfocitos T importante en la coestimulación de linfocitos T. CD137, conocido también como 4-1BB, transmite una potente señal coestimuladora a los linfocitos T, promoviendo la diferenciación y mejorando la supervivencia a largo plazo de los linfocitos T. CD3 $\zeta$  se asocia con TCR para producir una señal y contiene motivos de activación basados en tirosina de inmunoreceptores (ITAM, de sus siglas en inglés). El CD28, CD137 o CD3 zeta puede comprender menos que el CD28, CD137 o CD3 zeta completo, respectivamente.

A este respecto, el dominio de señalización de linfocitos T intracelular comprende una secuencia de aminoácidos de CD28 que comprende, que consiste en, o que consiste esencialmente en, la SEQ ID NO:16 o 19, una secuencia de aminoácidos de CD137 que comprende, que consiste en, o que consiste esencialmente en, la SEQ ID NO: 13 o 20, y/o una secuencia de aminoácidos de CD3 zeta que comprende, que consiste en, o que consiste esencialmente en, la SEQ ID NO:14, 17 o 21.

En una realización de la invención, el CAR comprende un dominio transmembrana que comprende CD28 y un dominio de señalización de linfocitos T intracelular que comprende CD28 y CD3 zeta. A este respecto, el CAR puede comprender cada una de las SEQ ID NO: 15-17. Preferentemente, el CAR comprende a) cada una de las SEQ ID NO: 1-6 y 15-17; b) 7-8 y 15-17; c) 9 y 15-17; o d) 9-10 y 15-17.

En una realización de la invención, el CAR comprende un dominio transmembrana que comprende CD8 y un dominio de señalización de linfocitos T intracelular que comprende CD28, CD137, y CD3 zeta. A este respecto, el CAR puede comprender cada una de las SEQ ID NO: 18-21. Preferentemente, el CAR comprende a) cada una de las SEQ ID NO: 1-6 y 18-21; b) 7-8 y 18-21; c) 9 y 18-21; o d) 9-10 y 18-21.

En una realización de la invención, el CAR comprende un dominio transmembrana que comprende CD8 y un dominio de señalización de linfocitos T intracelular que comprende CD137 y CD3 zeta. A este respecto, el CAR puede comprender cada una de las SEQ ID NO: 12-14. Preferentemente, el CAR comprende a) cada una de las SEQ ID NO: 1-6 y 12-14; b) 7-8 y 12-14; c) 9 y 12-14; o d) 9-10 y 12-14.

Realizaciones adicionales de la invención proporcionan CAR que comprenden, que consisten en, o que consisten esencialmente en cualquiera de, las secuencias de aminoácidos expuestas en la Tabla 1.

TABLA 1

SEQ ID NO:	Dominio de unión a antígeno	Dominios transmembrana y de señalización
SEQ ID NO: 22 (segunda generación, versión 2)	m971	-Dominio transmembrana de CD8 -Dominios de señalización de linfocitos T intracelular de CD137 y CD3ζ
SEQ ID NO: 23 (segunda generación, versión 1)	m971	-Dominio transmembrana de CD28 -Dominios de señalización de linfocitos T intracelular de CD28 y CD3ζ
SEQ ID NO: 24 (tercera generación)	m971	-Dominio transmembrana de CD8 -Dominios de señalización de linfocitos T intracelular de CD28, CD137 y CD3ζ

Las partes funcionales de los CAR inventivos descritos en el presente documento están incluidas en el alcance de la invención. La expresión "parte funcional" cuando se usa en referencia a un CAR se refiere a cualquier parte o fragmento del CAR de la invención, cuya parte o fragmento conserva la actividad biológica del CAR del cual forma parte (el CAR precursor). Las partes funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas partes de un CAR que retienen la capacidad de reconocer células diana, o detectar, tratar o prevenir una enfermedad, en una medida similar, en la misma medida, o en mayor medida, que el CAR precursor. En referencia al CAR precursor, la parte funcional puede comprender, por ejemplo, aproximadamente el 10 %, 25 %, 30 %, 50 %, 68 %, 80 %, 90 %, 95 % o más, del CAR precursor.

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

Las variantes funcionales de los CAR inventivos descritos en el presente documento están incluidas en el alcance de la invención. La expresión "variante funcional", como se usa en el presente documento, se refiere a un CAR, polipéptido o proteína que tiene una identidad o similitud de secuencia sustancial o significativa con un CAR precursor, cuya variante funcional retiene la actividad biológica del CAR del cual es una variante. Las variantes funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas variantes del CAR descritas en el presente documento (el CAR precursor) que conservan la capacidad de reconocer células diana en una medida similar, en la misma medida, o en mayor medida, que el CAR precursor. En referencia al CAR precursor, la variante funcional puede, por ejemplo, ser al menos aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o más idéntica en la secuencia de aminoácidos al CAR precursor.

Una variante funcional puede, por ejemplo, comprender la secuencia de aminoácidos del CAR precursor con al menos una sustitución de aminoácidos conservadora. De forma alternativa o adicional, las variantes funcionales pueden comprender la secuencia de aminoácidos del CAR precursor con al menos una sustitución de aminoácidos no conservadora. En este caso, es preferible que la sustitución de aminoácidos no conservadora no interfiera con o inhiba la actividad biológica de la variante funcional. La sustitución de aminoácidos no conservadora puede aumentar la actividad biológica de la variante funcional, de manera que la actividad biológica de la variante funcional se incrementa en comparación con el CAR precursor.

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

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

Los CAR de las realizaciones de la invención (que incluyen partes funcionales y variantes funcionales) pueden tener cualquier longitud, es decir, pueden comprender cualquier número de aminoácidos, siempre que los CAR (o partes funcionales o variantes funcionales de los mismos) conserven su actividad biológica, por ejemplo, la capacidad de unirse específicamente al antígeno, detectar células enfermas en un mamífero, o tratar o prevenir enfermedades en un mamífero, etc. Por ejemplo, el CAR puede tener una longitud de aproximadamente 50 a aproximadamente 5000 aminoácidos, tal como 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más aminoácidos de longitud.

Los CAR de las realizaciones de la invención (que incluyen partes funcionales y variantes funcionales de la invención) pueden comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos de origen natural. Dichos aminoácidos sintéticos son bien conocidos en la materia, e incluyen, por ejemplo, ácido aminociclohexano carboxílico, norleucina, ácido  $\alpha$ -amino n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometil-cisteína, trans-3- y trans-4-hidroxiprolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina,  $\beta$ -fenilserina  $\beta$ -hidroxifenilalanina, fenilglicina,  $\alpha$ -naftilalanina, ciclohexilalanina, ciclohexilglicina, ácido indolina-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico, ácido aminomalónico, monoamida del ácido aminomalónico, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, ornitina, ácido  $\alpha$ -aminociclohexano carboxílico, ácido  $\alpha$ -aminociclohexano carboxílico, ácido  $\alpha$ -aminocicloheptano carboxílico, ácido  $\alpha$ -(2-amino-2-norbornano)-carboxílico, ácido  $\alpha,\gamma$ -diaminobutírico, ácido  $\alpha,\beta$ -diaminopropiónico, homofenilalanina y  $\alpha$ -tert-butilglicina.

Los CAR de las realizaciones de la invención (que incluyen partes funcionales y variantes funcionales) pueden estar glucosilados, amidados, carboxilados, fosforilados, esterificados, N-acilados, ciclados a través de, por ejemplo, un puente disulfuro, o convertidos en una sal de adición de ácido y/u opcionalmente dimerizados o polimerizados, o conjugados.

Los CAR de las realizaciones de la invención (que incluyen partes funcionales y variantes funcionales) pueden obtenerse mediante métodos conocidos en la materia. Los CAR se pueden producir mediante cualquier método adecuado para producir polipéptidos o proteínas. Los métodos adecuados de síntesis *de novo* de polipéptidos y proteínas se describen en referencias, tales como Chan et al., *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2000; *Peptide and Protein Drug Analysis*, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; *Epitope Mapping*, Ed., Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2001; y la patente de EE.UU. 5.449.752. Asimismo, los polipéptidos y proteínas se pueden producir de forma recombinante utilizando los ácidos nucleicos descritos en el presente documento utilizando métodos recombinantes estándar. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; y Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, NY, 1994. Además, algunos de los CAR de la invención (que incluyen las partes funcionales y las variantes funcionales de los mismos) se pueden aislar y/o purificar a partir de una fuente, tal como una planta, una bacteria, un insecto, un mamífero, por ejemplo, una rata, un ser humano, etc. Los métodos de aislamiento y purificación son bien conocidos en la materia. Como alternativa, los CAR descritas en el presente documento (que incluyen partes funcionales y variantes funcionales de los mismos) se pueden sintetizar comercialmente por

compañías, tales como Synpep (Dublin, CA), Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD) y Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). A este respecto, los CAR inventivos pueden ser sintéticos, recombinantes, aislados y/o purificados.

- 5 Además, se desvela un anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo de los CAR de la invención. El anticuerpo puede ser cualquier tipo de inmunoglobulina que sea conocida en la materia. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser de cualquier isotipo, por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, etc. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de origen natural, por ejemplo, un anticuerpo aislado y/o purificado a partir de un mamífero, por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, pollo, hámster, ser humano, etc. Alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo de diseñado mediante ingeniería genética, por ejemplo, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. El anticuerpo puede estar en forma monomérica o polimérica. Asimismo, el anticuerpo puede tener cualquier nivel de afinidad o avidéz por la parte funcional del CAR inventivo.
- 10
- 15 Los métodos de prueba de anticuerpos para determinar la capacidad de unirse a cualquier parte funcional del CAR inventivo se conocen en la materia e incluyen cualquier ensayo de unión anticuerpo-antígeno, tal como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ELISA, transferencia Western, inmunoprecipitación y ensayos de inhibición competitiva (véase, por ejemplo, Janeway et al., *infra*, y la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. n.º 2002/0197266 A1).
- 20 Se conocen en la materia métodos adecuados para fabricar anticuerpos. Por ejemplo, los métodos de hibridoma estándar se describen en, por ejemplo, Köhler y Milsteint, *Eur. J. Immunol.*, 5, 511-519 (1976), Harlow y Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988), y C.A. Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 5ª Ed., Garland Publishing, Nueva York, NY (2001)). Como alternativa, otros métodos, tales como los métodos de hibridoma EBV (Haskard y Archer, *J. Immunol. Methods*, 74(2), 361-67 (1984), y Roder et al., *Methods Enzymol.*, 121, 140-67 (1986)), y los sistemas de expresión de vectores de bacteriófagos (véase, por ejemplo, Huse et al., *Science*, 246, 1275-81 (1989)) son conocidos en la materia. Además, los métodos para producir anticuerpos en animales no humanos se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.545.806, 5.569.825 y 5.714.352, y en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2002/0197266 A1.
- 25
- 30 Además, la visualización de fagos se puede utilizar para generar un anticuerpo. A este respecto, se pueden generar bibliotecas de fagos que codifican dominios variables (V) de unión a antígeno de anticuerpos utilizando técnicas estándar de biología molecular y ADN recombinante (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *supra*, y Ausubel et al., *supra*). Los fagos que codifican una región variable con la especificidad deseada se seleccionan para la unión específica al antígeno deseado, y se reconstituye un anticuerpo completo o parcial que comprende el dominio variable seleccionado. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo reconstituido se introducen en una línea celular adecuada, tal como una célula de mieloma utilizada para la producción de hibridomas, de modo que la célula secreta los anticuerpos que tienen las características de los anticuerpos monoclonales (véase, por ejemplo, Janeway et al., *supra*, Huse et al., *supra*, y la patente de EE.UU. 6.265.150).
- 35
- 40 Los ratones transgénicos pueden producir anticuerpos que son transgénicos para genes específicos de inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera. Dichos métodos son conocidos en la materia y se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.545.806 y 5.569.825, y Janeway et al., *supra*.
- Los métodos para generar anticuerpos humanizados son bien conocidos en la materia y se describen en detalle en, por ejemplo, Janeway et al., *supra*, las patentes de EE.UU. 5.225.539, 5.585.089 y 5.693.761, la patente europea n.º 0239400 B1 y la patente de Reino Unido n.º 2188638. Los anticuerpos humanizados también se pueden generar utilizando la tecnología de rechapado de anticuerpos descrita en la Patente de EE.UU. 5.639.641 y Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235, 959-973 (1994).
- 45
- 50 Además, se desvelan partes de unión a antígeno de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. La parte de unión a antígeno puede ser cualquier parte que tenga al menos; un sitio de unión a antígeno, tal como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, dsFv, sFv, diacuerpos y triacuerpos.
- Un fragmento de anticuerpo de fragmento de región variable (sFv) de cadena única, que es un fragmento Fab truncado que incluye el dominio variable (V) de una cadena pesada de anticuerpo unida a un dominio V de una cadena de anticuerpo ligera a través de un péptido sintético, se puede generar utilizando técnicas de tecnología de ADN recombinante de rutina (véase, por ejemplo, Janeway et al., *supra*). De forma similar, los fragmentos de región variable estabilizados con disulfuro (dsFv) se pueden preparar mediante tecnología de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Reiter et al., *Protein Engineering*, 7, 697-704 (1994)). Los fragmentos de anticuerpos de la invención, sin embargo, no se limitan a estos tipos ejemplares de fragmentos de anticuerpos.
- 55
- 60 Asimismo, el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, se puede modificar para que comprenda un marcador detectable, tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante) y partículas de elementos (por ejemplo, partículas de oro).
- 65

Además, una realización de la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los CAR descritos en el presente documento (incluidas las partes funcionales y las variantes funcionales de los mismos). Los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las secuencias líder, los dominios de unión a antígeno, los dominios transmembrana y/o los dominios de señalización de linfocitos T intracelulares descritos en el presente documento.

Una realización de la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder y un dominio de unión a antígeno (que incluye una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada). A este respecto, el ácido nucleico puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, la SEQ ID NO 25.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los dominios transmembrana y/o dominios de señalización de linfocitos T intracelulares descritos en el presente documento. Una realización de la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana que comprende CD28, un dominio de señalización de linfocitos T intracelular que comprende CD28, y un dominio de señalización de linfocitos T intracelular que comprende CD3 $\zeta$ . A este respecto, el ácido nucleico puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, la SEQ ID NO 27. Otra realización de la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana que comprende CD8, un dominio de señalización de linfocitos T intracelular que comprende CD28, un dominio de señalización de linfocitos T intracelular que comprende CD137, y un dominio de señalización de linfocitos T intracelular que comprende CD3 $\zeta$ . A este respecto, el ácido nucleico puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, la SEQ ID NO 28. Aún otra realización de la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana que comprende CD8, un dominio de señalización de linfocitos T intracelular que comprende CD137, y un dominio de señalización de linfocitos T intracelular que comprende CD3 $\zeta$ . A este respecto, el ácido nucleico puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, la SEQ ID NO 26.

En una realización de la invención, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder, un dominio de unión a antígeno (que incluye una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada), un dominio transmembrana que comprende CD28, un dominio de señalización de linfocitos T intracelular que comprende CD28, y un dominio de señalización de linfocitos T intracelular que comprende CD3 $\zeta$ . A este respecto, el ácido nucleico puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, las SEQ ID NO: 25 y 27.

En una realización de la invención, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder, un dominio de unión a antígeno [que incluye una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada), un dominio transmembrana que comprende CD8, un dominio de señalización de linfocitos T intracelular que comprende CD28, un dominio de señalización de linfocitos T intracelular que comprende CD137, y un dominio de señalización de linfocitos T intracelular que comprende CD3 $\zeta$ . A este respecto, el ácido nucleico puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, las SEQ ID NO: 25 y 28.

En una realización, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder, un dominio de unión a antígeno (que incluye una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada), un dominio transmembrana que comprende CD8, un dominio de señalización de linfocitos T intracelular que comprende CD137, y un dominio de señalización de linfocitos T intracelular que comprende CD3 $\zeta$ . A este respecto, el ácido nucleico puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, las SEQ ID NO: 25 y 26.

"Ácido nucleico", como se usa en el presente documento, incluye "polinucleótido", "oligonucleótido" y "molécula de ácido nucleico", y generalmente significa un polímero de ADN o ARN, que puede ser monocatenario o bicatenario, sintetizado u obtenido (por ejemplo, aislado y/o purificado) de fuentes naturales, que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, y que pueden contener un enlace internucleotídico natural, no natural o alterado, tal como un enlace de fosforamidato o un enlace de fosforotioato, en lugar del fosfodiéster encontrado entre los nucleótidos de un oligonucleótido no modificado. En algunas realizaciones, el ácido nucleico no comprende inserciones, deleciones, inversiones y/o sustituciones. Sin embargo, puede ser adecuado en algunos casos, como se describe en el presente documento, para que el ácido nucleico comprenda una o más inserciones, deleciones, inversiones y/o sustituciones. En algunas realizaciones, el ácido nucleico puede codificar secuencias de aminoácidos adicionales que no afectan a la función del CAR y que pueden o no traducirse tras la expresión del ácido nucleico mediante una célula hospedadora.

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

Un ácido nucleico recombinante puede ser uno que tiene una secuencia que no se produce de forma natural o tiene

una secuencia que se realiza mediante una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de otro modo. Esta combinación artificial a menudo se logra mediante síntesis química o, más comúnmente, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética, como las descritas en Sambrook et al., *supra*. Los ácidos nucleicos se pueden construir en base a la síntesis química y/o reacciones de ligadura enzimática utilizando procedimientos conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *supra*, y Ausubel et al., *supra*. Por ejemplo, un ácido nucleico se puede sintetizar químicamente utilizando nucleótidos de origen natural o nucleótidos modificados de manera diferente diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado tras la hibridación (por ejemplo, derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina). Los ejemplos de nucleótidos modificados que pueden utilizarse para generar los ácidos nucleicos incluyen, pero sin limitaciones, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-iodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N<sup>6</sup>-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N<sup>6</sup>-adenina sustituida, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N<sup>6</sup>-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosine, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo y 2,6-diaminopurina. Como alternativa, uno o más de los ácidos nucleicos de la invención se pueden comprar de compañías, como Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) y Synthegen (Houston, TX).

El ácido nucleico puede comprender cualquier secuencia de nucleótidos aislada o purificada que codifique cualquiera de los CAR o partes funcionales o variantes funcionales de los mismos. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos puede comprender una secuencia de nucleótidos que está degenerada a cualquiera de las secuencias o una combinación de secuencias degeneradas.

Una realización de la invención también proporciona un ácido nucleico aislado o purificado que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento o una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento.

La secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas puede hibridar en condiciones de alta rigurosidad. Por "condiciones de alta rigurosidad" se entiende que la secuencia de nucleótidos se hibrida específicamente con una secuencia diana (la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento) en una cantidad que es de forma detectable más fuerte que la hibridación no específica. Las condiciones de alta rigurosidad incluyen condiciones que distinguirían un polinucleótido con una secuencia complementaria exacta, o un que contenga solo algunos desapareamientos dispersos de una secuencia aleatoria que tenía algunas regiones pequeñas (por ejemplo, 3-10 bases) que coincidirían con la secuencia de nucleótidos. Estas pequeñas regiones de complementariedad se funden más fácilmente que un complemento de longitud completa de 14-17 o más bases, y la hibridación de alta rigurosidad las hace fácilmente distinguibles. Las condiciones de rigurosidad relativamente altas incluirían, por ejemplo, condiciones de baja sal y/o alta temperatura, tal como las que proporcionan aproximadamente NaCl 0,02-0,1 M o el equivalente, a temperaturas de aproximadamente 50-70 °C. Estas condiciones de alta rigurosidad toleran pocos, o ningún, desapareamiento entre la secuencia de nucleótidos y la plantilla o cadena diana, y son particularmente adecuadas para detectar la expresión de cualquiera de los CAR inventivos. En general, se aprecia que las condiciones pueden ser más estrictas si se agregan cantidades crecientes de formamida.

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

En una realización, los ácidos nucleicos de la invención se pueden incorporar en un vector de expresión recombinante. A este respecto, una realización de la invención proporciona vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos de la invención. Para los fines del presente documento, la expresión "vector de expresión recombinante" significa un constructo de oligonucleótido o polinucleótido modificado genéticamente que permite la expresión de un ARNm, proteína, polipéptido o péptido por una célula hospedadora, cuando el constructo comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el ARNm, proteína, polipéptido o péptido, y el vector se pone en contacto con la célula en condiciones suficientes para tener el ARNm, proteína, polipéptido o péptido expresado dentro de la célula. Los vectores de la invención no son de origen natural en su conjunto.

Sin embargo, partes de los vectores pueden ser de origen natural. Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden comprender cualquier tipo de nucleótidos, incluidos, pero sin limitación, ADN y ARN, que puede ser monocatenario o bicatenario, sintetizados u obtenidos en parte de fuentes naturales y que pueden contener

nucleótidos naturales, no naturales o alterados. Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender enlaces internucleotídicos de origen natural o de origen no natural, o ambos tipos de enlaces. Preferentemente, los nucleótidos o enlaces internucleotídicos de origen no natural o alterados no obstaculizan la transcripción o replicación del vector.

5 En una realización, el vector de expresión recombinante de la invención puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado, y puede utilizarse para transformar o transfectar cualquier célula hospedadora adecuada. Los vectores adecuados incluyen aquellos diseñados para la propagación y expansión o para la expresión o ambos, tal como plásmidos y virus. El vector puede seleccionarse del grupo que consiste en la serie pUC (Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, MD), la serie pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA), la serie pET (Novagen, Madison, WI), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), y la serie pEX (Clontech, Palo Alto, CA). También se pueden utilizar vectores de bacteriófagos, tales como  $\lambda$ GT10,  $\lambda$ GT11,  $\lambda$ ZapII (Stratagene),  $\lambda$ EMBL4 y  $\lambda$ NM1149. Los ejemplos de vectores de expresión de plantas incluyen pBI01, pBI101.2, pBII01.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). Los ejemplos de vectores de expresión animal incluyen pEUK-CI, pMAM, y pMAMneo (Clontech). El vector de expresión recombinante puede ser un vector viral, por ejemplo, un vector retroviral o un vector lentiviral. En algunas realizaciones, el vector puede ser un transposón.

20 Una serie de técnicas de transfección son generalmente conocidas en la materia (véase, por ejemplo, Graham et al., *Virology*, 52: 456-467 (1973); Sambrook et al., *supra*; Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier (1986); y Chu et al., *Gene*, 13: 97 (1981). Los métodos de transfección incluyen la precipitación conjunta con fosfato de calcio (véase, por ejemplo, Graham et al., *supra*), microinyección directa en células cultivadas (véase, por ejemplo, Capecchi, *Cell*, 22: 479-488 (1980)), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa et al., *BioTechniques*, 6: 742-751 (1988)), transferencia génica mediada por liposomas (véase, por ejemplo, Mannino et al., *BioTechniques*, 6: 682-690 (1988)), transducción mediada por lípidos (véase, por ejemplo, Feigner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7413-7417 (1987)), y suministro de ácido nucleico utilizando microproyectiles de alta velocidad (véase, por ejemplo, Klein et al., *Nature*, 327: 70-73 (1987)).

30 En una realización, los vectores de expresión recombinantes de la invención se pueden preparar utilizando técnicas de ADN recombinante estándar descritas en, por ejemplo, Sambrook et al., *supra*, y Ausubel et al., *supra*. Las construcciones de vectores de expresión, que son circulares o lineales, se pueden preparar para contener un sistema de replicación funcional en una célula hospedadora procarionota o eucariota. Los sistemas de replicación pueden proceder, por ejemplo, de ColE1, plásmido 2  $\mu$ ,  $\lambda$ , SV40, virus del papiloma bovino y similares.

35 El vector de expresión recombinante puede comprender secuencias reguladoras, tales como codones de iniciación y terminación de la transcripción y traducción, que son específicos para el tipo de célula hospedadora (por ejemplo, bacterias, hongos, planta o animal) en el que se va a introducir el vector, como apropiado, y teniendo en cuenta si el vector está basado en ADN o ARN. Los ejemplos de secuencias que incluyen codones de terminación incluyen las SEQ ID NO: 32-33. El vector de expresión recombinante puede comprender sitios de restricción para facilitar la clonación. Los ejemplos de secuencias que incluyen sitios de restricción incluyen las SEQ ID NO: 29-31.

40 El vector de expresión recombinante puede incluir uno o más genes marcadores, que permiten la selección de células hospedadoras transformadas o transfectadas. Los genes marcadores incluyen resistencia a biocidas, por ejemplo, resistencia a antibióticos, metales pesados, etc., complementación en un hospedador auxotrófico para proporcionar prototofia, y similares. Los genes marcadores adecuados para los vectores de expresión de la invención incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a neomicina/G418, genes de resistencia a higromicina, genes de resistencia a histidinol, genes de resistencia a tetraciclina y genes de resistencia a ampicilina.

50 El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor nativo o no nativo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el CAR (incluidas las partes funcionales y las variantes funcionales del mismo), o a la secuencia de nucleótidos que es complementaria a o que hibrida con la secuencia de nucleótidos que codifica el CAR. La selección de promotores, por ejemplo, fuerte, débil, inducible, específico de tejido y específico de desarrollo, está dentro de la habilidad habitual del experto. De forma similar, la combinación de una secuencia de nucleótidos con un promotor también está dentro de la habilidad del experto. El promotor puede ser un promotor no viral o un promotor viral, por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de SV40, un promotor de RSV, o un promotor encontrado en la repetición terminal larga del virus de células madre murinas.

60 Los vectores de expresión recombinante de la invención se pueden diseñar para una expresión transitoria, para una expresión estable, o para ambos. Asimismo, los vectores de expresión recombinantes se pueden hacer para la expresión constitutiva o para la expresión inducible.

Además, los vectores de expresión recombinantes se pueden hacer para incluir un gen suicida. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "gen suicida" se refiere a un gen que causa que la célula que expresa el gen suicida muera. El gen suicida puede ser un gen que confiere sensibilidad a un agente, por ejemplo, un fármaco, sobre la célula en la que se expresa el gen, y hace que la célula muera cuando la célula se pone en contacto o se expone al agente. Los genes suicidas son conocidos en la materia (véase, por ejemplo, *Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews*, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of

Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humana Press, 2004) e incluyen, por ejemplo, el gen de la timidina quinasa (TK) del virus del herpes simple (VHS), la citosina daminasa, la purina nucleósido fosforilasa y la nitrorreductasa.

Se incluyen en el alcance de la invención conjugados, por ejemplo, bioconjugados, que comprenden cualquiera de los CAR inventivos (incluidas cualquiera de las partes funcionales o variantes de los mismos), ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras, poblaciones de células hospedadoras o anticuerpos, o partes de unión a antígeno de los mismos. Los conjugados, así como los métodos para sintetizar conjugados en general, son conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Hudecz, F., *Methods Mol. Biol.* 298: 209-223 (2005) y Kirin et al., *Inorg Client.* 44(15): 5405-5415 (2005)).

Una realización de la invención proporciona además una célula hospedadora que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinante descritos en el presente documento. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "célula hospedadora" se refiere a cualquier tipo de célula que pueda contener el vector de expresión recombinante de la invención. La célula hospedadora puede ser una célula eucariota, por ejemplo, planta, animal, hongo o alga, o puede ser una célula procariota, por ejemplo, bacteria o protozoo. La célula hospedadora puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente de un organismo, por ejemplo, un ser humano. La célula hospedadora puede ser una célula adherente o una célula suspendida, es decir, una célula que crece en suspensión. Dichas células hospedadoras son bien conocidos en la materia, e incluyen, por ejemplo, células DH5 $\alpha$  de *E. coli*, células de ovario de hámster chino, células VERO de mono, células COS, células HEK293, similares. Con el fin de amplificar o replicar el vector de expresión recombinante, la célula hospedadora puede ser una célula procariota, por ejemplo, una célula DH5 $\alpha$ . Para los fines de producir un CAR recombinante, la célula hospedadora puede ser una célula de mamífero. La célula hospedadora puede ser una célula humana. Si bien la célula hospedadora puede ser de cualquier tipo celular, puede originarse a partir de cualquier tipo de tejido y puede estar en cualquier etapa de desarrollo, la célula hospedadora puede ser un linfocito de sangre periférica (PBL, de sus siglas en inglés) o una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC, de sus siglas en inglés). La célula hospedadora puede ser un linfocito T.

Para los fines del presente documento, el linfocito T puede ser cualquier linfocito T, tal como un linfocito T cultivado, por ejemplo, un linfocito T primario o un linfocito T de una línea de linfocitos T cultivada, por ejemplo, Jurkat, SupT1, etc., o un linfocito T obtenido de un mamífero. Si se obtiene de un mamífero, el linfocito T se puede obtener de numerosas fuentes, que incluyen, aunque no se limitan a sangre, médula ósea, ganglios linfáticos, el timo u otros tejidos o líquidos. Los linfocitos T también pueden enriquecerse o purificarse. El linfocito T puede ser un linfocito T humano. El linfocito T puede ser un linfocito T aislado de un ser humano. El linfocito T puede ser cualquier tipo de linfocito T y puede estar en cualquier etapa de desarrollo, incluyendo, aunque no de forma limitativa, linfocitos T positivos dobles CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, linfocitos T auxiliares CD4<sup>+</sup>, por ejemplo, linfocitos Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub>, linfocitos T CD8<sup>+</sup> (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos), células infiltrantes de tumores, linfocitos T de memoria, linfocitos T ingenuos y similares. El linfocito T puede ser un linfocito T CD8<sup>+</sup> o un linfocito T CD4<sup>+</sup>.

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

Los CAR (incluidas las partes y variantes funcionales de los mismos), ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras (incluidas las poblaciones de las mismas) y anticuerpos (incluidas las partes de unión a antígeno de los mismos), todos los cuales se denominan colectivamente como "materiales CAR inventivos" a continuación, pueden ser aislados y/o purificados. El término "aislado" como se usa en el presente documento significa que se ha eliminado de su entorno natural. El término "purificado" o "aislado" no requiere pureza absoluta ni aislamiento; más bien, se pretende como un término relativo. Por lo tanto, por ejemplo, una preparación de células hospedadoras purificada (o aislada) es aquella en la que la célula hospedadora es más pura que las células en su entorno natural dentro del cuerpo. Dichas células hospedadoras pueden producirse, por ejemplo, mediante técnicas de purificación estándar. En algunas realizaciones, una preparación de una célula hospedadora se purifica de tal manera que la célula hospedadora representa al menos aproximadamente el 50 %, por ejemplo, al menos aproximadamente el 70 %, del contenido total de células de la preparación. Por ejemplo, la pureza puede ser al menos aproximadamente el 50 %, puede ser mayor que aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 % o aproximadamente el 80 %, o puede ser aproximadamente el 100 %.

Los materiales CAR inventivos se pueden formular en una composición, tal como una composición farmacéutica. A este respecto, una realización de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los CAR, partes funcionales, variantes funcionales, ácidos nucleicos, vectores de expresión, células  
5 hospedadoras (incluidas poblaciones de las mismas) y anticuerpos (incluidas partes de unión a antígeno), y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de la invención que contienen, cualquiera de los materiales CAR inventivos pueden comprender más de un material CAR inventivo, por ejemplo, un CAR y un ácido nucleico, o dos o más CAR diferentes. Como alternativa, la composición farmacéutica puede comprender un material CAR inventivo en combinación con otros agentes o fármacos farmacéuticamente activos, tales como  
10 agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cisplatino, daunorrubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende la célula hospedadora de la invención o poblaciones de la misma.

15 Los materiales CAR inventivos se pueden proporcionar en forma de una sal, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen aquellas procedentes de ácidos minerales, tales como ácidos clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, nítrico y sulfúrico, y ácidos orgánicos, tales como ácidos tartárico, acético, cítrico, málico, láctico, fumárico, benzoico, glicólico, glucónico, succínico y arilsulfónico, por ejemplo, ácido *p*-toluensulfónico.

20 Con respecto a las composiciones farmacéuticas, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser cualquiera de los utilizados convencionalmente y está limitado solo por consideraciones químico-físicas, tales como la solubilidad y la falta de reactividad con el (los) agente(s) activo(s), y por la vía de administración. Los vehículos farmacéuticamente aceptables descritos en el presente documento, por ejemplo, vehículos, adyuvantes, excipientes y diluyentes, son bien conocidos por los expertos en la materia y están fácilmente disponibles para el público. Se  
25 prefiere que el vehículo farmacéuticamente aceptable sea uno que sea químicamente inerte a los agentes activos y uno que no tenga efectos secundarios perjudiciales o toxicidad en las condiciones de uso.

La elección del vehículo se determinará en parte por el material CAR de la invención particular, así como por el  
30 método particular utilizado para administrar el material CAR de la invención. Por consiguiente, hay una variedad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica de la invención. Se pueden utilizar conservantes. Los conservantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sodio y cloruro de benzalconio. Se puede utilizar opcionalmente una mezcla de uno o más conservantes. El conservante o mezclas de los mismos están presentes normalmente en una cantidad de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 2 %  
35 en peso de la composición total.

Los agentes tamponantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, ácido cítrico, citrato sódico, ácido fosfórico, fosfato de potasio, y varios otros ácidos y sales. Se puede utilizar opcionalmente una mezcla de dos o más agentes tamponantes. El agente tamponante o mezclas de los mismos están presentes normalmente en una cantidad de  
40 aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 4 % en peso de la composición total.

La concentración del material CAR inventivo en las formulaciones farmacéuticas puede variar, por ejemplo, desde menos de aproximadamente el 1 %, generalmente en o al menos aproximadamente el 10 %, hasta aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 50 % o más en peso, y se puede seleccionar principalmente por volúmenes de fluidos y viscosidades, de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado.  
45

Los métodos para preparar composiciones administrables (por ejemplo, administrables por vía parenteral) son conocidos o evidentes para los expertos en la materia y se describen con más detalle en, por ejemplo, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams & Wilkins; 21ª ed. (1 de mayo de 2005).  
50

Las siguientes formulaciones para administración oral, en aerosol, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intradérmica, interperitoneal e intratecal) y tópica son meramente ejemplares y de ninguna manera son limitantes. Se puede utilizar más de una ruta para administrar los materiales CAR de la invención, y en ciertos casos, una ruta particular puede proporcionar una respuesta más inmediata y más eficaz que otra ruta.  
55

Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden comprender o consistir en (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz del material CAR de la invención disuelto en diluyentes, tal como agua, solución salina o zumo de naranja; (b) cápsulas, sobres, comprimidos, pastillas y trociscos, conteniendo cada una cantidad predeterminada del principio activo, como sólidos o gránulos; (c) polvos; (d) suspensiones en un líquido apropiado; y (e) emulsiones adecuadas. Las formulaciones líquidas pueden incluir diluyentes, tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico y los alcoholes de polietileno, con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable. Las formas de la cápsula pueden ser del tipo ordinario de gelatina dura o de gel blando que contiene, por ejemplo, tensioactivos, lubricantes y rellenos inertes, tales como lactosa, sacarosa, fosfato de calcio y almidón de maíz. Las formas de comprimidos pueden incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, celulosa microcristalina, goma arábiga, gelatina, goma guar,  
60  
65

dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa de sodio, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de zinc, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes tamponantes, agentes disgregantes, agentes humectantes, conservantes, agentes aromatizantes, y otros excipientes farmacológicamente compatibles. Las formas de pastillas pueden comprender el material CAR inventivo en un sabor, usualmente sacarosa y goma arábica o tragacanto, así como pastillas que comprenden el material CAR inventivo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica, emulsiones, geles y similares que contienen, además de, dichos excipientes conocidos en la materia.

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

10 Los aceites, que se pueden utilizar en formulaciones parenterales incluyen aceites de petróleo, animales, vegetales o sintéticos. Los ejemplos específicos de aceites incluyen maní, soja, sésamo, semillas de algodón, maíz, aceituna, vaselina y minerales. Los ácidos grasos adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico y ácido isostárico. El oleato de etilo y el miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácidos grasos adecuados.

15 Los jabones adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen sales de metales alcalinos grasos, amonio y trietanolamina, y los detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos tales como, por ejemplo, haluros de dimetil dialquil amonio y haluros de alquil piridinio, (b) detergentes aniónicos tales como, por ejemplo, sulfonatos de alquilo, arilo y olefina, sulfatos de alquilo, olefina, éter y monoglicéridos, y sulfosuccinatos, (c) detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, óxidos de aminas grasas, alcanolamidas de ácidos grasos y copolímeros de polioxitileno-polipropileno, (d) detergentes anfóteros tales como, por ejemplo, sales de amonio cuaternario de alquil- $\beta$ -aminopropionatos y 2-alquil-imidazolina, y (e) mezclas de los mismos.

20 Las formulaciones parenterales contendrán normalmente, por ejemplo, desde aproximadamente el 0,5 % hasta aproximadamente el 25 % en peso del material CAR inventivo en solución. Se pueden utilizar conservantes y tampones. Con el fin de minimizar o eliminar la irritación en el lugar de la inyección, dichas composiciones pueden contener uno o más tensioactivos no iónicos que tienen, por ejemplo, un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB, de sus siglas en inglés) de aproximadamente 12 a aproximadamente 17. La cantidad de tensioactivo en dichas formulaciones variará normalmente, por ejemplo, desde aproximadamente el 5 % hasta aproximadamente el 15 % en peso. Los tensioactivos adecuados incluyen ésteres de ácidos grasos de sorbitán polietilenglicol, tales como monooleato de sorbitán y los aductos de alto peso molecular de óxido de etileno con una base hidrófoba, formados por la condensación de óxido de propileno con propilenglicol. Las formulaciones parenterales se pueden presentar en recipientes sellados de dosis unitarias o de dosis múltiples, tales como ampollas y viales, y se pueden almacenar en un estado liofilizado (liofilizado) que requiere solo la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.

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

30 Las formulaciones tópicas, que incluyen aquellas que son útiles para la liberación transdérmica de fármacos, son bien conocidas por los expertos en la materia y son adecuadas en el contexto de realizaciones de la invención para aplicación a la piel. El material CAR inventivo, solo o en combinación con otros componentes adecuados, se puede convertir en formulaciones en aerosol para administrarse mediante inhalación. Estas formulaciones en aerosol se pueden colocar en propulsores aceptables a presión, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares. También pueden formularse como productos farmacéuticos para preparaciones sin presión, tales como en un nebulizador o un atomizador. Dichas formulaciones en aerosol también se pueden utilizar para pulverizar la mucosa.

35 Una "cantidad eficaz" o "una cantidad eficaz para tratar" se refiere a una dosis que es adecuada para prevenir o tratar el cáncer en un individuo. Las cantidades eficaces para un uso terapéutico o profiláctico dependerán, por ejemplo, de la etapa y la gravedad de la enfermedad o trastorno que se esté tratando, la edad, el peso y el estado

general de salud del paciente, y el criterio del médico que prescribe. El tamaño de la dosis también estará determinado por el principio activo seleccionado, el método de administración, el momento y la frecuencia de administración, la existencia, la naturaleza y el alcance de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar a la administración de un principio activo en particular, y el efecto fisiológico deseado. Un experto en la materia apreciará que diversas enfermedades o trastornos pueden requerir un tratamiento prolongado que implique múltiples administraciones, tal vez utilizando los materiales CAR inventivos en cada una o varias rondas de administración. A modo de ejemplo y sin intención de limitar la invención, la dosis del material CAR inventivo puede ser de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal del sujeto tratado/día, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal/día, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal/día. Cuando el material CAR de la invención es una célula hospedadora, una dosis ejemplar de células hospedadoras puede ser un mínimo de un millón de células (1 mg de células/dosis). Cuando el material CAR de la invención es un ácido nucleico empaquetado en un virus, una dosis ejemplar de virus puede ser 1 ng/dosis.

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

Para los fines de la invención, un ensayo, que comprende, por ejemplo, comparar el grado en que las células diana se lisan y/o el IFN- $\gamma$  se secreta por los linfocitos T que expresan el CAR inventivo tras la administración de una dosis dada de dichos linfocitos T a un mamífero, entre un conjunto de mamíferos a los que se les da una dosis diferente de linfocitos T, podría utilizarse para determinar la dosis inicial que se administrará a un mamífero. La medida en que se lisan las células diana y/o el IFN- $\gamma$  se secreta tras la administración de una cierta dosis se puede analizar mediante métodos conocidos en la materia.

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

Los sistemas de suministro útiles en el contexto de las realizaciones de la invención pueden incluir sistemas de suministro de liberación constante, liberación retardada y liberación prolongada, de modo que el suministro de la composición de la invención se produce antes y con tiempo suficiente para causar la sensibilización del sitio a ser tratado. La composición de la invención se puede utilizar junto con otros agentes terapéuticos o terapias. Dichos sistemas pueden evitar administraciones repetidas de la composición de la invención, aumentando así la conveniencia para el sujeto y el médico, y pueden ser particularmente adecuados para ciertas realizaciones de la composición de la invención.

Muchos tipos de sistemas de suministro de liberación están disponibles y son conocidos por los expertos en la materia. Incluyen sistemas de bases de polímeros tales como poli(lactida-glicolida), copolioxalatos, policaprolactonas, poliésteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico y polianhídridos. Las microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.075.109. Los sistemas de suministro también incluyen sistemas no poliméricos que son lípidos que incluyen esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono- di- y tri-glicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; revestimientos de cera; comprimidos comprimidos utilizando aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fundidos; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, aunque no de forma limitativa a: (a) sistemas de erosión en los que la composición activa está contenida en una forma dentro de una matriz como las descritas en las patentes de EE.UU. 4.452.775, 4.667.014, 4.748.034 y 5.239.660 y (b) sistemas difusionales en que un componente activo se impregna a una velocidad controlada de un polímero tal como se describe en las patentes de EE.UU. 3.832.253 y 3.854.480. Además, se pueden utilizar sistemas de suministro de hardware basados en bombas, algunos de los cuales están adaptados para la implantación.

Un experto ordinario en la materia apreciará fácilmente que los materiales CAR inventivos de la invención se pueden modificar de varias formas, de manera que la eficacia terapéutica o profiláctica de los materiales CAR inventivos se incremente a través de la modificación. Por ejemplo, los materiales CAR inventivos se pueden conjugar directa o indirectamente a través de un conector a una fracción de direccionamiento. La práctica de la combinación de compuestos, por ejemplo, materiales CAR de la invención, para dirigir fracciones, es conocida en la materia. Véase, por ejemplo, Wadwa et al., *J. Drug Targeting* 3: 111 (1995) y la patente de EE.UU. 5.087.616.

Como alternativa, los materiales CAR de la invención se pueden modificar en una forma de depósito, de tal manera que la manera en que los materiales CAR de la invención se liberan en el cuerpo al que se administra se controla con respecto al tiempo y la ubicación dentro del cuerpo (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 4.450.150). Las formas de depósito de los materiales CAR de la invención pueden ser, por ejemplo, una composición implantable que comprende los materiales CAR de la invención y un material poroso o no poroso, tal como un polímero, en el que los materiales CAR inventivos están encapsulados o difundidos por todo el material y/o la degradación del material no poroso. Luego, el depósito se implanta en la ubicación deseada dentro del cuerpo y los materiales CAR inventivos se liberan del implante a una velocidad predeterminada.

Cuando los materiales CAR inventivos se administran con uno o más agentes terapéuticos adicionales, se pueden administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales conjuntamente al mamífero. Por "coadministración" se entiende la administración de uno o más agentes terapéuticos adicionales y los materiales CAR de la invención lo suficientemente cerca en el tiempo, de manera que los materiales CAR de la invención pueden aumentar el efecto de uno o más agentes terapéuticos adicionales, o viceversa. A este respecto, los materiales CAR inventivos se pueden administrar primero y el uno o más agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar segundo, o viceversa. Como alternativa, los materiales CAR inventivos y el uno o más agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar simultáneamente. Un agente terapéutico ejemplar que se puede coadministrar con los materiales CAR es IL-2. Se cree que la IL-2 aumenta el efecto terapéutico de los materiales CAR inventivos. Para los fines de los métodos de la invención, en los que las células hospedadoras o las poblaciones de células se administran al mamífero, las células pueden ser células alogénicas o autólogas para el mamífero.

Se contempla que las composiciones farmacéuticas de la invención, CAR, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras o poblaciones de células se pueden utilizar para el uso de métodos para tratar o prevenir una enfermedad en un mamífero. Sin estar vinculado a una teoría o mecanismo particular, los CAR inventivos tienen actividad biológica, por ejemplo, capacidad para reconocer antígenos, por ejemplo, CD22, de modo que cuando se expresan por una célula, el CAR es capaz de mediar una respuesta inmunitaria contra la célula que expresa el antígeno, por ejemplo, CD22, para el cual el CAR es específico. A este respecto, una realización de la invención proporciona los CAR, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células hospedadoras o las composiciones farmacéuticas de la invención para su uso en un método para tratar o prevenir el cáncer en un mamífero, que comprende administrar al mamífero los CAR, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes y/o las composiciones farmacéuticas de la invención en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el cáncer en el mamífero.

Una realización de la invención comprende además la linforreducción del mamífero antes de administrar los materiales CAR inventivos. Los ejemplos de linforreducción incluyen, pero no se limitan a, quimioterapia de linforreducción no mieloblástica, quimioterapia de linforreducción mieloblástica, irradiación corporal total, etc.

Para los fines de los métodos de la invención, en los que se administran células hospedadoras, las células pueden ser células alogénicas o autólogas para el mamífero. Preferentemente, las células son autólogas para el mamífero.

El mamífero al que se hace referencia en el presente documento puede ser cualquier mamífero. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "mamífero" se refiere a cualquier mamífero, que incluye, pero no se limita a, mamíferos del orden Rodentia, como ratones y hámsters, y mamíferos del orden Logomorpha, como conejos. Los mamíferos pueden ser del orden Carnívora, incluidos los felinos (gatos) y los caninos (perros). Los mamíferos pueden ser del orden Artiodactyla, incluidos los bovinos (vacas) y los porcinos (cerdos) o del Orden Perissodactyla, incluidos los equinos (caballos). Los mamíferos pueden ser del orden Primates, Ceboidea o Simioides (monos) o del orden Antropoides (seres humanos y simios). Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

Con respecto a los métodos de la invención, el cáncer puede ser cualquier tipo de cáncer, incluido cualquiera de cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rhabdomyosarcoma alveolar, cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma de vejiga), cáncer de huesos, cáncer cerebral (por ejemplo, meduloblastoma), cáncer de mama, cáncer del ano, canal anal o ano recto, cáncer de ojo, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de las articulaciones, cáncer de cuello, vesícula biliar, o pleura, cáncer de nariz, cavidad nasal u oído medio, cáncer de la cavidad oral, cáncer de vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer esofágico, cáncer de cuello de útero, fibrosarcoma, tumor carcinoide gastrointestinal, cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia, tumores líquidos, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas), linfoma, mesotelioma maligno, mastocitoma, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de la nasofaringe, linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica B, tricoleucemia, leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de Burkitt, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de peritoneo, omento y mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, cáncer de tejidos blandos, tumores sólidos, cáncer de estómago, cáncer de testículos, cáncer de tiroides; y cáncer de uréter. Preferentemente, el cáncer es una malignidad hematológica (por ejemplo, leucemia o linfoma, que incluye, pero no se limita a, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica B, tricoleucemia, leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de

Burkitt). Preferentemente, el cáncer se caracteriza por la expresión de CD22.

Los términos "tratar," y "prevenir", así como las palabras derivadas de los mismos, como se usa en el presente documento, no implican necesariamente un tratamiento o prevención del 100 % o completos. Por el contrario, existen diversos grados de tratamiento o prevención, de los cuales un experto en la materia reconoce que tiene un beneficio potencial o efecto terapéutico. A este respecto, los métodos de la invención pueden proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de tratamiento o prevención del cáncer en un mamífero. Adicionalmente, el tratamiento o la prevención proporcionada por el método de la invención puede incluir el tratamiento o la prevención de una o más afecciones o síntomas de la enfermedad, por ejemplo, cáncer, que se está tratando o previniendo. Asimismo, para los fines del presente documento, "prevención" puede abarcar el retraso del inicio de la enfermedad, o un síntoma o afección de la misma.

Otra realización de la invención proporciona los CAR, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras o composiciones farmacéuticas de la invención, para su uso en un método para tratar o prevenir el cáncer en un mamífero.

Además, se desvela un método para detectar la presencia de cáncer en un mamífero, que comprende: (a) poner en contacto una muestra que comprende una o más células del mamífero con los CAR, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células hospedadoras, la población de células, los anticuerpos y/o las partes de unión a antígeno de los mismos de la invención, formando así un complejo, (b) y detectar el complejo, en el que la detección del complejo es indicativa de la presencia de cáncer en el mamífero.

La muestra se puede obtener por cualquier método adecuado, por ejemplo, biopsia o necropsia. Una biopsia es la extracción de tejido y/o células de un individuo. Dicha extracción puede consistir en recoger tejido y/o células del individuo para realizar la experimentación en el tejido y/o células extraídos. Esta experimentación puede incluir experimentos para determinar si el individuo tiene y/o sufre de una determinada afección o estado de enfermedad. La afección o enfermedad puede ser, por ejemplo, cáncer.

Con respecto a la divulgación del método para detectar la presencia de cáncer en un mamífero, la muestra que comprende células del mamífero puede ser una muestra que comprende células completas, lisados de las mismas, o una fracción de los lisados celulares completos, por ejemplo, una fracción nuclear o citoplásmica, una fracción de proteína completa, o una fracción de ácido nucleico. Si la muestra comprende células completas, las células pueden ser cualquier célula del mamífero, por ejemplo, las células de cualquier órgano o tejido, incluidas células sanguíneas o células endoteliales.

Para los fines del método de detección desvelado, la puesta en contacto puede tener lugar *in vitro* o *in vivo* con respecto al mamífero. Preferentemente, la puesta en contacto en *in vitro*.

Asimismo, la detección del complejo puede ocurrir de varias formas conocidas en la materia. Por ejemplo, los TCR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras, poblaciones de células o anticuerpos, o partes de unión a antígeno de los mismos de la invención, descritos en el presente documento, se pueden marcar con un marcador detectable tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante) y partículas de elementos (por ejemplo, partículas de oro).

Los métodos de prueba de un CAR para la capacidad de reconocer células diana y para la especificidad de antígeno son conocidos en la materia. Por ejemplo, Clay et al., *J. Immunol.*, 163: 507-513 (1999), enseña métodos para medir la liberación de citocinas (por ejemplo, interferón- $\gamma$ , factor estimulante de colonias de granulocitos/monocitos (GM-CSF, de sus siglas en inglés), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) o interleucina 2 (IL-2). Además, la función CAR se puede evaluar mediante la medición de la citotoxicidad celular, como se describe en Zhao et al., *J. Immunol.*, 174: 4415-4423 (2005).

Los siguientes ejemplos ilustran más la invención pero, por supuesto, no deben interpretarse de ningún modo como limitantes de su alcance.

#### EJEMPLO 1

Este ejemplo demuestra la síntesis de CAR anti-CD22, la transducción de PBMC con CAR anti-CD22 y el análisis de la expresión de la superficie de los CAR en PBMC transducidas.

Las secuencias que codifican los CAR se sintetizaron utilizando algoritmos de optimización de codones (Mr. Gene GmBH, Regensburg, Alemania) y se subclonaron en vectores de "destino" como se describe en (Zhao y otros, *J. Immunol.*, 183(9):5563-74 (2009)) que codifican secuencias de una primera versión de CAR de segunda generación (dominios de señalización de linfocitos T intracelulares y transmembrana de CD28 y dominio de señalización de células de T intracelulares de cadena CD3-zeta), una segunda versión de CAR de segunda generación (dominio transmembrana de CD8 unido a dominios de señalización de linfocitos T de CD137 y CD3-zeta), o un CAR de

tercera generación (dominio transmembrana de CD8 unido a dominios de señalización de linfocitos T intracelulares de CD28, CD137 y CD3-zeta) como se muestra en la Tabla A.

TABLA A

SEQ ID NO:	Dominio de unión a antígeno	Componentes adicionales
CAR HA22-segunda generación, versión 1	HA22	-CH2CH3 -dominio transmembrana de CD28 -dominios de señalización de linfocitos T intracelulares de CD28 y CD3 $\zeta$
CAR HA22-tercera generación	HA22	-CH2CH3 -Dominio transmembrana de CD8 -dominios de señalización de linfocitos T intracelulares de CD28, CD137 y CD3 $\zeta$
CAR HASH22-segunda generación, versión 1	HA22	-secuencia corta de dominio constante de inmunoglobulina -dominio transmembrana de CD28 -Dominios de señalización de linfocitos T intracelular de CD28 y CD3 $\zeta$
CAR HASH22-tercera generación	HA22	-secuencia corta de dominio constante de inmunoglobulina -dominio transmembrana de CD8 -dominios de señalización de linfocitos T intracelulares de CD28, CD137 y CD3 $\zeta$
CAR BL22-segunda generación	BL22	-CH2CH3 -dominio transmembrana de CD28, -Dominios de señalización de linfocitos T intracelular de CD28 y CD3 $\zeta$
CAR BL22-tercera generación	BL22	-CH2CH3 -Dominio transmembrana de CD8 -dominios de señalización de linfocitos T intracelulares de CD28, CD1.37 y CD3 $\zeta$
CAR HASH22-segunda generación, versión 2	HA22	-secuencia corta de dominio constante de inmunoglobulina -Dominio transmembrana de CD8 -Dominios de señalización de linfocitos T intracelular de CD137 y CD3 $\zeta$
CAR m971-segunda generación, versión 1 (SEQ ID NO: 23)	m971	-Dominio transmembrana de CD28 -dominios de señalización de linfocitos T intracelulares de CD28 y CD3 $\zeta$
CAR m971-tercera generación(SEQ ID NO: 24)	m971	-Dominio transmembrana de CD8 -dominios de señalización de linfocitos T intracelulares de CD28, CD137 y CD3 $\zeta$
CAR m971-segunda generación, versión 2 (SEQ ID NO: 22)	m971	-Dominio transmembrana de CD8 -Dominios de señalización de linfocitos T intracelular de CD137 y CD3 $\zeta$

5 Se crearon sobrenadantes de vectores retrovirales mediante la transfección de células 293GP con plásmidos que codifican vectores retrovirales de CAR y la glucoproteína de envoltura de RD114, recogiendo sobrenadantes de cultivo (s/n) 48-72 horas más tarde. Los sobrenadantes de cultivo se congelaron o se utilizaron inmediatamente para transducir PBMC humanas activadas con OKT3 e IL-2 utilizando el método "en placa" durante 2 días consecutivos (cultivo de linfocitos en placas recubiertas con RECTRONECTIN (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) antes de exponerse a diluciones de vectores que contienen s/n) como se describió anteriormente en Y. Zhao et al., *J. Immunol.*, 183: 5563 (2009). También se utilizó en este estudio el s/n retroviral que contiene un CAR específico para CD19 de una línea celular de productor permanente (Kochenderfer et al., *Blood*, 116: 4099 (2010)).

15 La expresión del CAR en los linfocitos T transducidos se determinó mediante citometría de flujo. Para medir directamente el número de células capaces de unirse a CD22 en virtud del dominio CH2CH3, se utilizó IgG antihumana de cabra (H&L) (Invitrogen, Grand Island, NY). Para detectar los CAR que no codifican CH2CH3, CD22-Fc (R&D Systems) seguido de anti IgG-Fc PE (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). El CAR HA22SH expresa una secuencia corta de dominio constante de inmunoglobulina en lugar de CH2CH3. El CAR CD19 se detectó utilizando la proteína L. La proteína L biotinilada (50 ng/ul, Thermo Scientific, Waltham, MA) se unió, las células se lavaron, y luego se detectaron con SA-PE (4 ug/ml, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Por comparación, también se evaluó un s/n del vector del CAR CD19. Los experimentos de citometría de flujo

confirmaron la expresión de CAR en linfocitos T transducidos. Los CAR de segunda generación demostraron niveles de expresión en la superficie aumentados en comparación con los CAR de tercera generación medidos mediante la intensidad de fluorescencia media (MFI, de sus siglas en inglés).

5 EJEMPLO 2

Este ejemplo demuestra la expresión de antígenos CD22 y CD19 en líneas celulares de leucemia.

10 Las líneas celulares de leucemia humana (REH, SEM, NALM6, KOPN8, Daudi, Raji y K562) se evaluaron para determinar el nivel de expresión de CD19 y CD22 en la superficie celular utilizando perlas de PE QUANTI-BRITE (BD Biosciences); y anticuerpos anti-CD19 y anti-CD22 marcados con PE (Tabla 2). "Número de receptores por célula" indica el número absoluto aproximado de moléculas por célula en cada una de las líneas celulares indicadas. Los datos se calcularon mediante la determinación de los anticuerpos unidos por célula (ABC, de sus siglas en inglés) utilizando las herramientas de análisis de datos del software CELLQUEST (BD) de acuerdo con las  
15 instrucciones del fabricante.

TABLA 2

Línea celular de leucemia	Número de receptores por célula
REH CD19	15.100
SEM CD19	50.800
NALM-6 CD19	50.500
KOPN-8 CD19	60.800
Daudi CD19	15.000
Raji CD19	50.000
K562 CD19	< 100
REH CD22	7.000
SEM CD22	7.000
NALM-6 CD22	8.000
KOPN-8 CD22	15.300
Daudi CD22	8.000
Raji CD22	60.800
K562 CD22	< 200

20 EJEMPLO 3

Este ejemplo demuestra la actividad lítica de las células que expresan el CAR m971 de segunda generación (versión 1).

25 Para determinar la actividad lítica, las líneas celulares de leucemia (REH, SEM, NALM6, KOPN8, Daudi, Raji y K562) se marcaron con <sup>51</sup>Cr y se utilizaron como dianas en los ensayos de citotoxicidad. Las células no se transdujeron (simulado) o se transdujeron con el CAR m971 de segunda generación (versión 1) (SEQ ID NO: 23), el CAR anti-CD19 o el CAR HASH22 de segunda generación (versión 1) y se utilizaron como células efectoras en varias relaciones de efector a diana en los ensayos de citotoxicidad. El porcentaje de lisis de las células diana se midió y se muestra en la Figura 1A-1G.

30 Como se muestra en las figuras 1A-1G, las linfocitos Transducidas con el CAR m971 de segunda generación (versión 1) (SEQ ID NO: 23) lisaron las líneas celulares de leucemia REM, SEM, NAL.M6, KOPN8, Daudi y Raji que expresan CD22, y no lisaron la línea celular K562 que no expresa CD22. Las linfocitos Transducidas con el CAR m971 de segunda generación (versión 1) (SEQ ID NO: 23) demostraron una capacidad lítica superior en  
35 comparación con las linfocitos Transducidas con el CAR HASH22 de segunda generación (versión 1).

40 Se analizaron siete muestras de pacientes con BCP-ALL para determinar la expresión de CD22 y CD19. Se observó una amplia gama de expresión de antígenos, como se demostró mediante análisis de citometría de flujo. Algunos pacientes mostraron una fuerte positividad para ambos antígenos, mientras que otros mostraron una disminución en la tinción de CD22. En cada caso, los CAR específicos de CD22 confirieron actividad lítica anti-leucémica a linfocitos de terceros.

## EJEMPLO 4

Este ejemplo demuestra la actividad lítica de linfocitos T que expresan un CAR m971.

- 5 Para determinar si las construcciones de CAR de segunda o tercera generación proporcionaron mayor actividad lítica, las líneas celulares de leucemia Raji (CD22<sup>alto</sup>), NALM6-GL (CD22<sup>bajo</sup>) o K562 (CD22-negativo) se marcaron con <sup>51</sup>Cr y se utilizaron como dianas en ensayos de citotoxicidad. Las células efectoras eran linfocitos T humanos que eran no transducidos (simulado) o transducidos con el CAR m971 -segunda generación, versión 1 (SEQ ID NO: 23) o el CAR m971-tercera generación (SEQ ID NO: 24). Las células efectoras se cultivaron conjuntamente con  
10 células diana en varias relaciones de efector a diana (E:D). Los resultados se muestran en las figuras 2A-2C.

Como se muestra en las figuras 2A-2C, los CAR m971 de segunda generación demostraron una actividad lítica superior en comparación con los CAR m971 de tercera generación.

## 15 EJEMPLO 5

Este ejemplo demuestra la reactividad de linfocitos T que expresan un CAR m971.

- 20 Linfocitos T no transducidos (simulado) o transducidos con uno de los siguientes CAR: anti-CD19, m971 de segunda generación versión 1 (SEQ ID NO: 23), m971 de tercera generación (SEQ ID NO: 24), HASH22 de segunda generación versión 1, HASH22 de segunda generación versión 2, o HASH22 de tercera generación se cultivaron conjuntamente con líneas celulares de leucemia Raji (CD22<sup>alto</sup>), NALM6-GL (CD22<sup>bajo</sup>), o K562 (CD22 negativo) y las cantidades de interferón (IFN)- $\gamma$ , factor de necrosis tumoral (TNF)  $\alpha$ , e interleucina (IL)-2 secretadas se midieron. Los resultados se muestran en las figuras 3A-3I.

- 25 Como se muestra en las figuras 3A-3I, las linfocitos Transducidas con el CAR m971-segunda generación, versión 1 secretaron mayores cantidades de IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF $\alpha$  en respuesta al cultivo conjunto con líneas celulares que expresan CD22 en comparación con los CAR m971 de tercera generación.

## 30 EJEMPLO 6

Este ejemplo demuestra que las células transducidas con el CAR m971 retrasan la progresión de la enfermedad y alargan la duración de la supervivencia *in vivo* en comparación con un CAR HA22.

- 35 Los ratones NOD scid gamma (NSG, de sus siglas en inglés) inmunodeficientes se inyectaron en el día 0 con  $0,5 \times 10^6$  NALM6-GL (NALM6 transfectado con luciferasa). El día 3, los ratones se trataron con  $1 \times 10^7$  linfocitos T no transducidos (simulado) o linfocitos T transducidos con el CAR HASH22 de segunda generación, versión 1 o el CAR m971-segunda generación, versión 1 (SEQ ID NO: 23). La carga tumoral se midió en términos de señales bioluminiscentes para cada ratón como fotones/s/cm<sup>2</sup>/sr con imágenes bioluminiscentes utilizando el instrumento  
40 Xenogen IVIS. A los ratones se les inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) 3 mg de D-luciferina (Caliper Life Sciences, Inc., Hopkinton, MA) y 4 minutos después de la inyección, se tomaron imágenes de ratones anestesiados con un tiempo de exposición de 30 segundos. El software LIVING IMAGE se utilizó para analizar las señales bioluminiscentes de cada ratón como fotones/s/cm<sup>2</sup>/sr en los días 3, 7 y 15. La intensidad de la señal se trazó a lo largo del tiempo y los resultados se muestran en la figura 4A.

- 45 Como se muestra en la figura 4A, todos los ratones tenían una enfermedad equivalente en el Día 3. Los ratones tratados con linfocitos T transducidos con el CAR m971-segunda generación, versión 1 (SEQ ID NO: 23) redujeron la carga tumoral en comparación con los ratones tratados con células de control o linfocitos Transducidas con el CAR HA22.

- 50 La supervivencia de los ratones se midió durante 50 días, las estadísticas de supervivencia se calcularon utilizando el análisis de Log-rank (Mantel-Cox), y los resultados de supervivencia se muestran en la figura 4B. Como se muestra en la figura 4B, los ratones tratados con linfocitos T transducidos con el CAR m971-segunda generación, versión 1 (SEQ ID NO: 23) demostraron una mayor supervivencia en comparación con los ratones tratados con  
55 células de control o linfocitos Transducidas con el CAR HA22.

- Para determinar si el fracaso del tratamiento se debió a una pérdida antigénica, se sometieron los ratones a eutanasia debido a la carga de la enfermedad de acuerdo con el protocolo institucional, y se analizaron los bazo  
60 mediante citometría de flujo. Antes de la terapia, se observaron altos niveles de expresión de CAR en HASH-28z y m971-28z, linfocitos T transducidos, y las células NALM6-GL expresaron tanto CD19 como CD22. Tras el sacrificio, los bazo se analizaron primero para la expresión de CD45 y GFP humano. Las células positivas GFP bloqueadas representan un tumor, y después de un análisis adicional, esta población bloqueada continuó expresando GFP. Sin embargo, las células CD45 positivas y GFP negativas que quedaron ya no expresaron el CAR anti-CD22. Esto indica que la leucemia continuó expresando CD22 y que los linfocitos T de CAR no persistieron en el momento del sacrificio.  
65 Cuando se repitió el experimento y los ratones se sacrificaron el día 12, cuando los linfocitos T terapéuticos aún tenían un efecto, podían detectarse fácilmente en la sangre, el bazo y la médula ósea. El CAR

m971-28z (segunda generación, versión 1) mostró una capacidad mucho mayor para infiltrarse en la médula ósea.

EJEMPLO 7

5 Este ejemplo demuestra una curva de respuesta a la dosis para la transferencia adoptiva de células que expresan un CAR m971.

10 Los ratones NSG (inmunodeficientes) se inyectaron con  $0,5 \times 10^6$  células NALM6-GL el día 0. En el día 3, se tomó una imagen de los animales utilizando un sustrato de luciferina para confirmar la presencia de leucemia. En el día 3, a los ratones portadores de leucemia se les inyectaron por vía intravenosa (iv) linfocitos T no transducidos (simulado) o  $15 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$ , o  $1 \times 10^5$  linfocitos T transducidos con una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR m971-segunda generación, versión 2 (SEQ ID NO: 22). La eficacia de transducción del CAR de los linfocitos T transducidos fue del 90 %. Los linfocitos T se estimularon con perlas anti-CD3/CD28 (1:1), se cultivaron en 40 unidades/ml de interleucina-2 y se inyectaron en ratones 10 días después de la estimulación inicial. Se tomaron imágenes de los ratones nuevamente el día 5 y el día 8. Los resultados se muestran en las Figuras 5 y 6. Un cambio en el sombreado de gris a blanco indica un aumento de la carga tumoral en la figura 5. En la Figura 6, una disminución en los fotones indica una disminución en la carga tumoral. Como se muestra en las Tablas 5 y 6, la eliminación completa de la leucemia se observó con el nivel de dosis más alto el día 8.

20 El uso de los términos "un" y "una" y "el" y "la" y "al menos uno" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) deben interpretarse como inclusivos tanto del singular como del plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. El uso de la expresión "al menos uno" seguido de una lista de uno o más elementos (por ejemplo, "al menos uno de A y B") debe interpretarse como un elemento seleccionado de los elementos enumerados (A o B) ) o cualquier combinación de dos o más de los elementos enumerados (A y B), a menos que se afirme lo contrario o se contradiga claramente por el contexto. Las expresiones "que comprende", "que tiene", "que incluye", y "que contiene" deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significa "que incluye, aunque no de forma limitativa, a,") a no ser que se señale de otro modo. La recitación de los intervalos de valores en el presente documento simplemente pretende servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que entre dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor separado se incorpore a la especificación como si se hubiera recitado individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento, está destinado simplemente a clarificar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse como que indica que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.

40 LISTADO DE SECUENCIAS

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

45 <120> RECEPTORES DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS M971

<130> 714144

50 <150> US 61/717.960

<151> 24/10/2012

<160> 33

55 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> Sintético

65 <400> 1

ES 2 718 903 T3

Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala  
1 5 10

5 <210> 2  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Sintético  
<400> 2

Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn  
1 5

15 <210> 3  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Sintético  
<400> 3

Ala Arg Glu Val Thr Gly Asp Leu Glu Asp Ala Phe Asp Ile  
1 5 10

25 <210> 4  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Sintético  
<400> 4

Gln Thr Ile Trp Ser Tyr  
1 5

35 <210> 5  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Sintético  
<400> 5

Ala Ala Ser  
1

50 <210> 6  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
55 <220>

ES 2 718 903 T3

<223> Sintético

<400> 6

Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Gln Thr Phe  
 1 5 10

5

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

15

<400> 7

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Trp Ser Tyr  
 20 25 30

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

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

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

20

<210> 8

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Sintético

30

<400> 8

ES 2 718 903 T3

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

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

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala  
 50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn  
 65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val  
 85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Thr Gly Asp Leu Glu Asp Ala Phe Asp  
 100 105 110

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

5 <210> 9  
 <211> 236  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintético  
 <400> 9

ES 2 718 903 T3

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

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

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala  
 50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn  
 65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val  
 85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Thr Gly Asp Leu Glu Asp Ala Phe Asp  
 100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly  
 115 120 125

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 130 135 140

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Trp Ser  
 145 150 155 160

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu  
 165 170 175

Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
 180 185 190

Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
 195 200 205

Ala Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro  
 210 215 220

Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 225 230 235

<210> 10  
 <211> 22

ES 2 718 903 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Sintético  
  
 <400> 10  
  
 Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro  
 1 5 10 15  
  
 Ala Phe Leu Leu Ile Pro  
 20  
 10  
 <210> 11  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Sintético  
  
 <400> 11  
 20  
  
 Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5  
  
 <210> 12  
 <211> 69  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintético  
 30  
 <400> 12  
  
 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 Ile  
 35 40 45  
  
 Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val  
 50 55 60  
  
 Ile Thr Leu Tyr Cys  
 65  
 35 <210> 13  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 40 <220>

ES 2 718 903 T3

<223> Sintético

<400> 13

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

5

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

15 <400> 14

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

20

<210> 15

<211> 65

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Sintético

<400> 15

ES 2 718 903 T3

Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr  
 1 5 10 15

Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro  
 20 25 30

Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu  
 35 40 45

Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val  
 50 55 60

Arg  
 65

5 <210> 16  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintético  
 <400> 16

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

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

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser  
 35 40

15 <210> 17  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintético  
 <400> 17

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

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

ES 2 718 903 T3

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

5 <210> 18  
 <211> 84  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintético  
 <400> 18

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

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

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

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

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

His Arg Asn Arg

15 <210> 19  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintético  
 <400> 19

ES 2 718 903 T3

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

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

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser  
 35 40

<210> 20  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintético

<400> 20

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe  
 1 5 10 15

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly  
 20 25 30

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu  
 35 40 45

<210> 21  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintético

<400> 21

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

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

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

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

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg



ES 2 718 903 T3

Ser Gln Thr Ile Trp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly  
 180 185 190

Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly  
 195 200 205

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 210 215 220

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
 225 230 235 240

Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu  
 245 250 255

Ile Lys Ala Ala Ala Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro  
 260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



ES 2 718 903 T3

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser  
145 150 155 160

Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala  
165 170 175

Ser Gln Thr Ile Trp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly  
180 185 190

Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly  
195 200 205

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
210 215 220

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
225 230 235 240

Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu  
245 250 255

Ile Lys Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp  
260 265 270

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

Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu  
290 295 300

Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val  
305 310 315 320

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

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

His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser  
355 360 365

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

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr



ES 2 718 903 T3

Leu Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val  
 130 135 140

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser  
 145 150 155

Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala  
 165 170 175

Ser Gln Thr Ile Trp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly  
 180 185 190

Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly  
 195 200 205

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 210 215 220

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
 225 230 235 240

Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu  
 245 250 255

Ile Lys Ala Ala Ala Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr  
 260 265 270

Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser  
 275 280 285

Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly  
 290 295 300

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

Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile  
 325 330 335

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

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

Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg

ES 2 718 903 T3

370	375	380	
Ser 385	Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile		400
		390	395
Phe 405	Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp		415
		405	410
Gly 420	Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu		430
		420	425
Arg 435	Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly		445
		435	440
Gln 450	Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr		460
		450	460
Asp 465	Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys		480
		470	475
Pro 485	Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys		495
		485	490
Asp 500	Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg		510
		500	505
Arg 515	Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala		525
		515	520
Thr 530	Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		540
		530	540

<210> 25  
 <211> 774  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintético

<400> 25

atgcttctgc tcgtgacaag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccctgc ctttctgctg	60
atccctcagg tgcagctgca gcagctctggc cctggcctcg tgaagcctag ccagaccctg	120
agcctgacct gtgccatcag cggcgatagc gtgtccagca atagcgccgc ctggaactgg	180
atcagacaga gccctagcag aggcctggaa tggctgggcc ggacctacta ccggtccaag	240
tggtacaacg actacgccgt gtccgtgaag tcccgatca ccatcaaccc cgacaccagc	300
aagaaccagt tctccctgca gctgaacagc gtgacccccg aggataccgc cgtgtactac	360

ES 2 718 903 T3

tgcgccagag aagtgaccgg cgacctgga gatgccttcg acatctgggg ccagggcaca 420  
 atggtcaccg tgtctagcgg aggcggcgga agcgacatcc agatgacaca gagccccagc 480  
 tccctgagcg ccagcgtggg agacagagtg accatcacct gtcgggccag ccagaccatc 540  
 tggctcctacc tgaactggta tcagcagcgg cctggcaagg cccccaacct gctgatctat 600  
 gccgccagct cactgcagag cggcgtgcc agcagatttt ccggcagagg cagcggcacc 660  
 gacttcaccc tgacaatcag tccctgcag gccgaggact tcgccaccta ctactgccag 720  
 cagagctaca gcatccccca gaccttcggc caggggacca agctggaaat caaa 774

5 <210> 26  
 <211> 672  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintético  
 <400> 26

accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagcccctg 60  
 tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 120  
 gacttcgct gtgatatcta catctgggcg cccttggccg ggacttgtgg ggtccttctc 180  
 ctgtcactgg ttatcacctt ttactgcaaa cggggcagaa agaaactcct gtatatattc 240  
 aaacaacat ttatgagacc agtacaact actcaagagg aagatggctg tagctgccga 300  
 tttccagaag aagaagaagg aggatgtgaa ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac 360  
 gccccgcgt acaagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga 420  
 gaggagtacg atgttttggg caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg 480  
 agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag 540  
 gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt 600  
 taccaggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg cccttcacat gcaggccctg 660  
 cccctcgct aa 672

15 <210> 27  
 <211> 654  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintético  
 <400> 27

gttatgtatc ctctcctta cctagacaat gagaagagca atggaacat tatccatgtg 60  
 25 aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttccggac cttctaagcc cttttgggtg 120

ES 2 718 903 T3

ctgggtggg ttgggtgagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 180  
 attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctctgcaca gtgactacat gaacatgact 240  
 ccccgcgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 300  
 gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgccccgc gtaccagcag 360  
 ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 420  
 gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 480  
 gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag tgagattggg 540  
 atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca 600  
 gccaccaagg acacctacga cgcccttcac atgcaggccc tgccccctcg ctaa 654

5 <210> 28  
 <211> 852  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintético

<400> 28

ttcgtgccgg tcttctgcc agcgaagccc accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca 60  
 ccggcgccca ccatcgcgtc gcagcccctg tccttgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg 120  
 gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg gacttcgcct gtgatatacta catctgggcg 180  
 cccttggccg ggacttgtgg ggtccttctc ctgtcactgg ttatcaccct ttactgcaac 240  
 cacaggaaca ggagtaagag gagcaggctc ctgcacagtg actacatgaa catgactccc 300  
 cgccgccccg ggcccaccg caagcattac cagccctatg ccccaccacg cgacttcgca 360  
 gcctatcgct cccgtttctc tgttgtaaa cggggcagaa agaagctcct gtatatattc 420  
 aaacaacat ttatgagacc agtaciaaact actcaagagg aagatggctg tagctgccga 480  
 tttccagaag aagaagaagg aggatgtgaa ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac 540  
 gccccgcgt accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga 600  
 gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg 660  
 agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag 720  
 gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt 780  
 taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg cccttcacat gcaggccctg 840  
 ccccctcgct aa 852

15 <210> 29  
 <211> 6  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

# ES 2 718 903 T3

	<220> <223> Sintético	
5	<400> 29 <b>ctcgag</b>	6
10	<210> 30 <211> 8 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Sintético	
	<400> 30 <b>gcggccgc</b>	8
20	<210> 31 <211> 6 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Sintético	
	<400> 31 <b>ggatcc</b>	6
30	<210> 32 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sintético	
	<400> 32 <b>taaggatccg ataaaataa</b>	19
40	<210> 33 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sintético	
50	<400> 33 <b>ctaaggatcc gataa</b>	15

**REIVINDICACIONES**

1. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une específicamente a CD22, comprendiendo el CAR: un dominio de unión a antígeno que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 1, una CDR2 de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 2, una CDR3 de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 3, una CDR1 de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 4, una CDR2 de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 5, una CDR3 de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 6, un dominio transmembrana y un dominio de señalización de linfocitos T intracelular.
2. El CAR de la reivindicación 1, en donde:
- (a) el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 7; y/o
  - (b) el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 8; y/o
  - (c) el dominio de unión a antígeno comprende un conector que comprende la SEQ ID NO: 11; y/o
  - (d) el CAR comprende además una secuencia líder que comprende la SEQ ID NO: 10.
3. El CAR de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde el dominio de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 9.
4. El CAR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el dominio transmembrana comprende un dominio transmembrana de i) CD8 y/o ii) CD28, en donde el dominio transmembrana de CD8 comprende la SEQ ID NO: 12 o 18 y/o en donde el dominio transmembrana de CD28 comprende la SEQ ID NO: 15.
5. El CAR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el dominio de señalización de linfocitos T intracelular comprende un dominio de señalización intracelular de uno o más de i) CD28, ii) CD137, y iii) CD3 zeta, en donde el dominio de señalización de linfocitos T intracelular comprende uno o más de
- (a) una secuencia de aminoácidos de CD28 que comprende la SEQ ID NO: 16 o 19,
  - (b) una secuencia de aminoácidos de CD137 que comprende la SEQ ID NO: 13 o 20, y
  - (c) una secuencia de aminoácidos de CD3 zeta que comprende la SEQ ID NO: 14, 17 o 21.
6. El CAR de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el dominio de señalización de linfocitos T intracelular comprende la secuencia de aminoácidos del dominio de señalización intracelular de CD28 o CD137.
7. El CAR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 22-24.
8. El CAR de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el dominio de señalización de linfocitos T intracelular comprende la secuencia de aminoácidos del dominio de señalización intracelular de CD137 o CD3 zeta.
9. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el CAR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
10. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 25, preferentemente en donde el ácido nucleico comprende además una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 26-28.
11. Un vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 9 o la reivindicación 10.
12. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión recombinante de la reivindicación 11.
13. Una composición farmacéutica que comprende el CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, el ácido nucleico de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, el vector de expresión recombinante de la reivindicación 11, o la célula hospedadora de la reivindicación 12, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, el ácido nucleico de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, el vector de expresión recombinante de la reivindicación 11, la célula hospedadora de la reivindicación 12, o la composición farmacéutica de la reivindicación 13 para su uso como un medicamento.
15. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, el ácido nucleico de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, el vector de expresión recombinante de la reivindicación 11, la célula hospedadora de la reivindicación 12, o la composición farmacéutica de la reivindicación 13 para su uso en un método para tratar o prevenir el cáncer.

16. El CAR, ácido nucleico, vector de expresión recombinante, célula hospedadora, o composición para el uso de la reivindicación 15, en donde el cáncer comprende un linfoma de linfocitos B o una leucemia de linfocitos B.

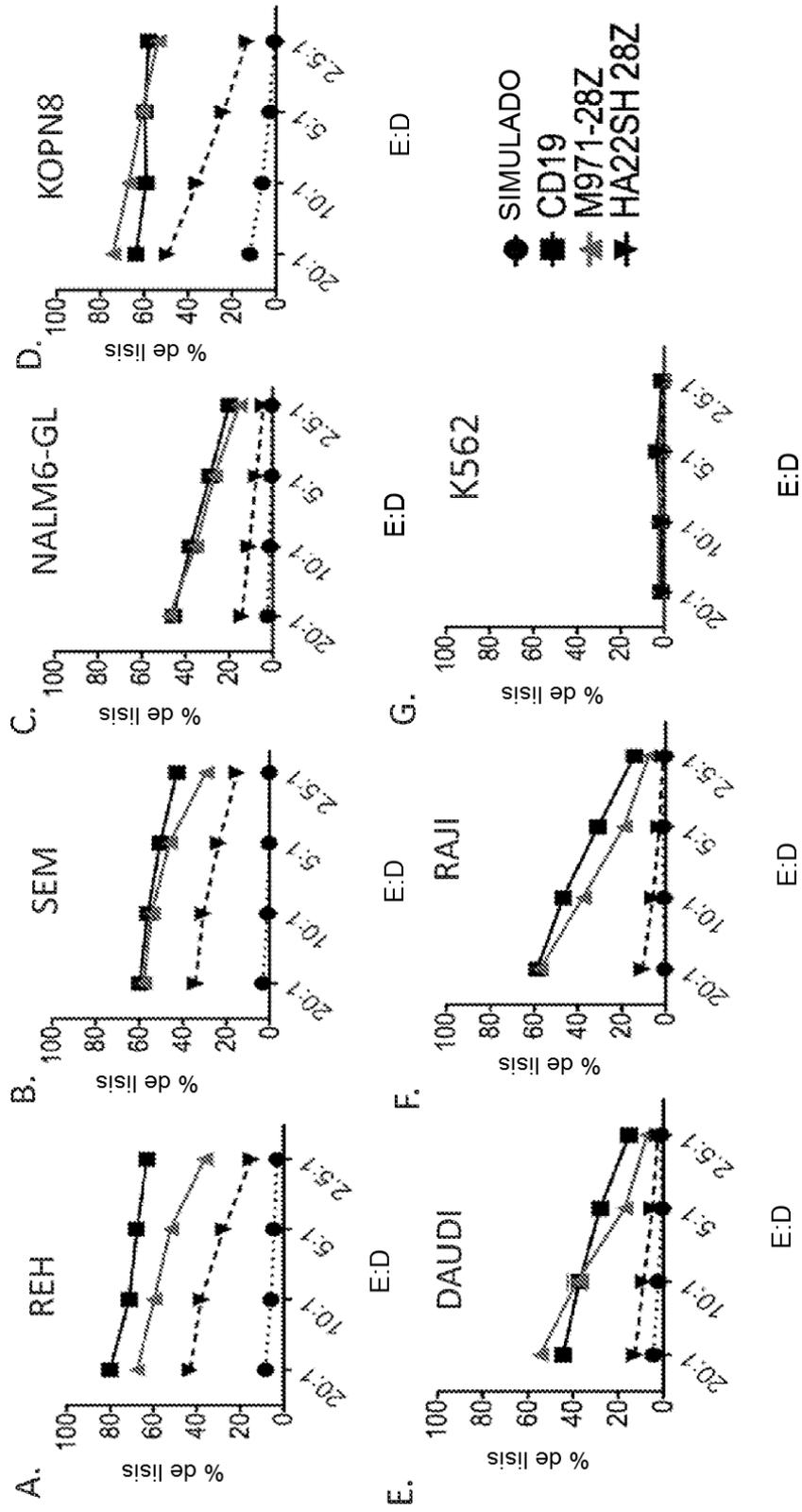
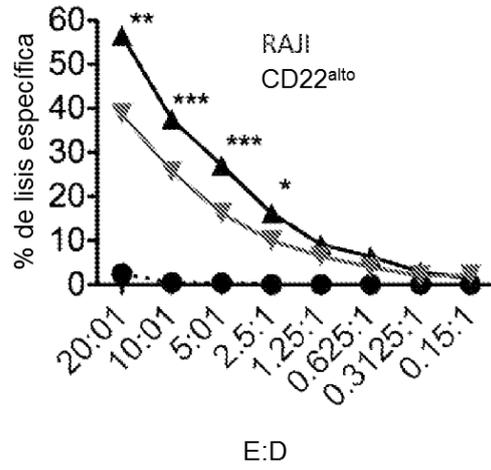
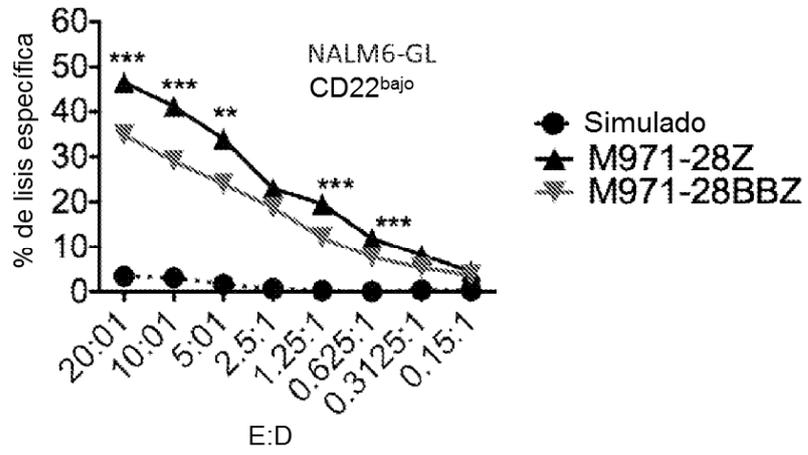


FIG. 1

A.



B.



C.

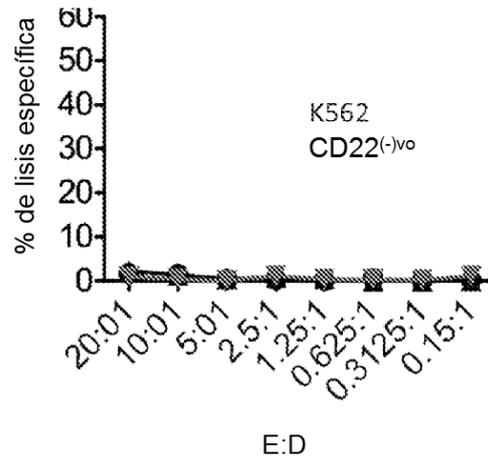


FIG. 2

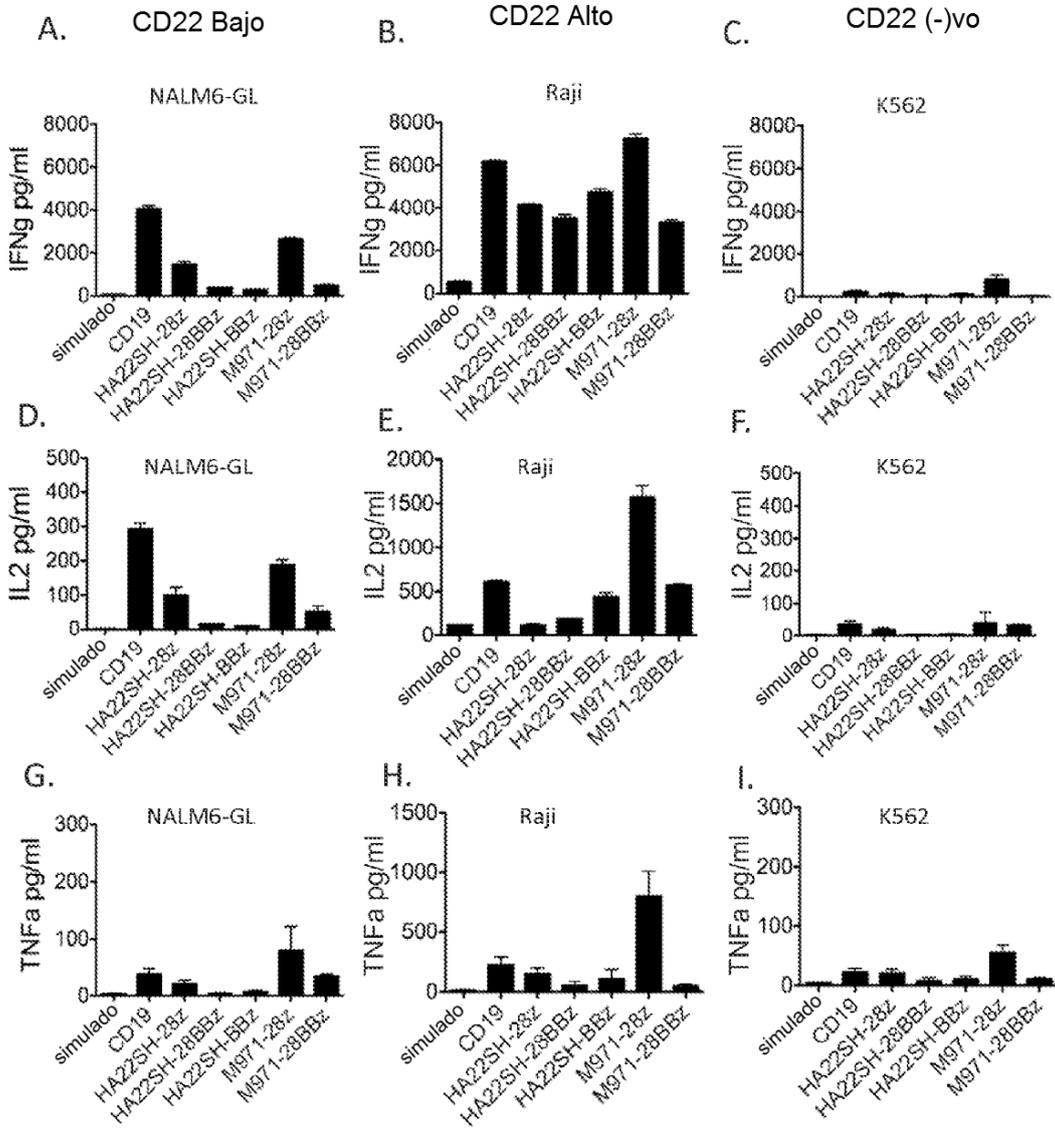


FIG. 3

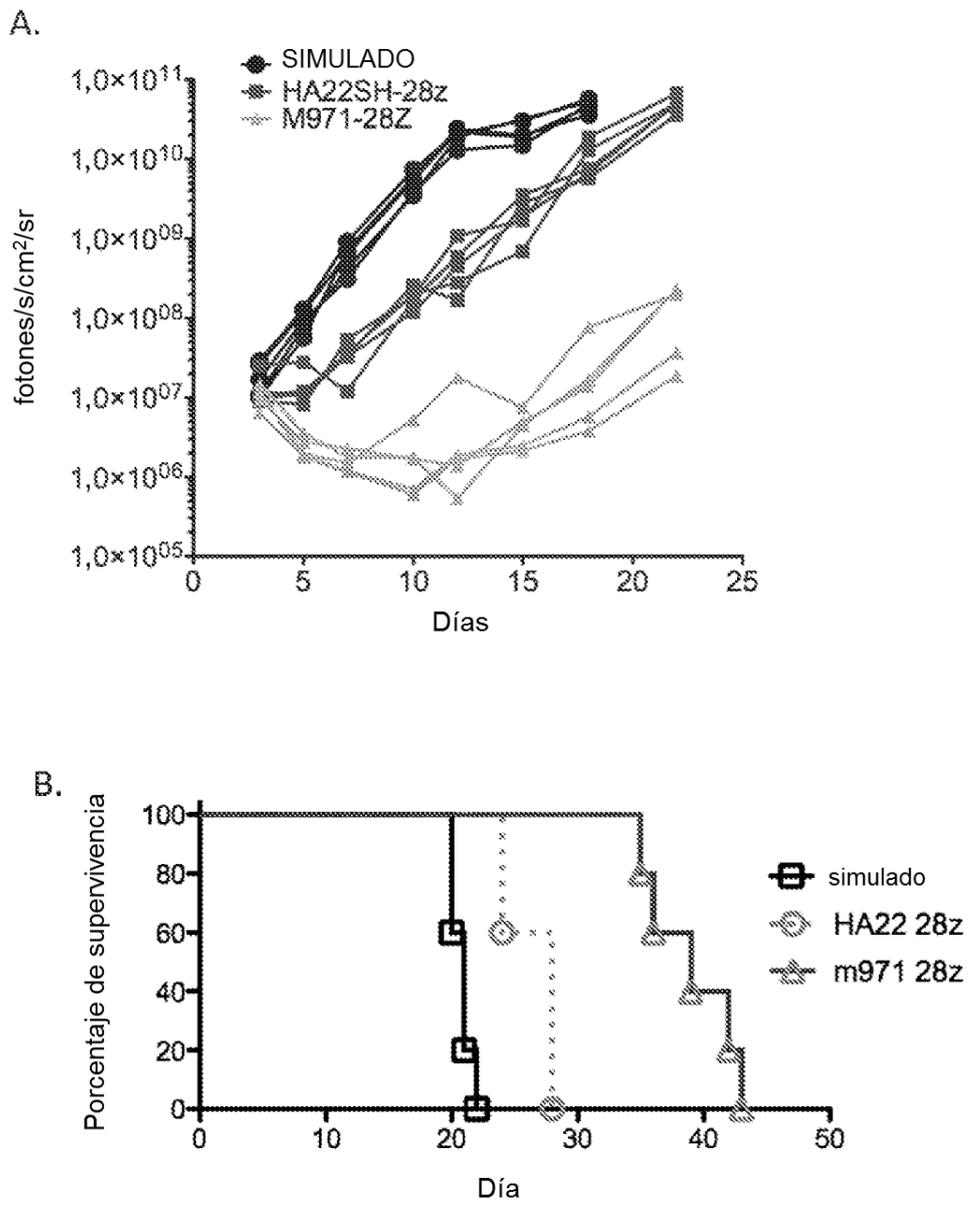


FIG. 4

Dosis	$15 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	simulado
DÍA 3					
DÍA 5					
DÍA 8					

FIG. 5

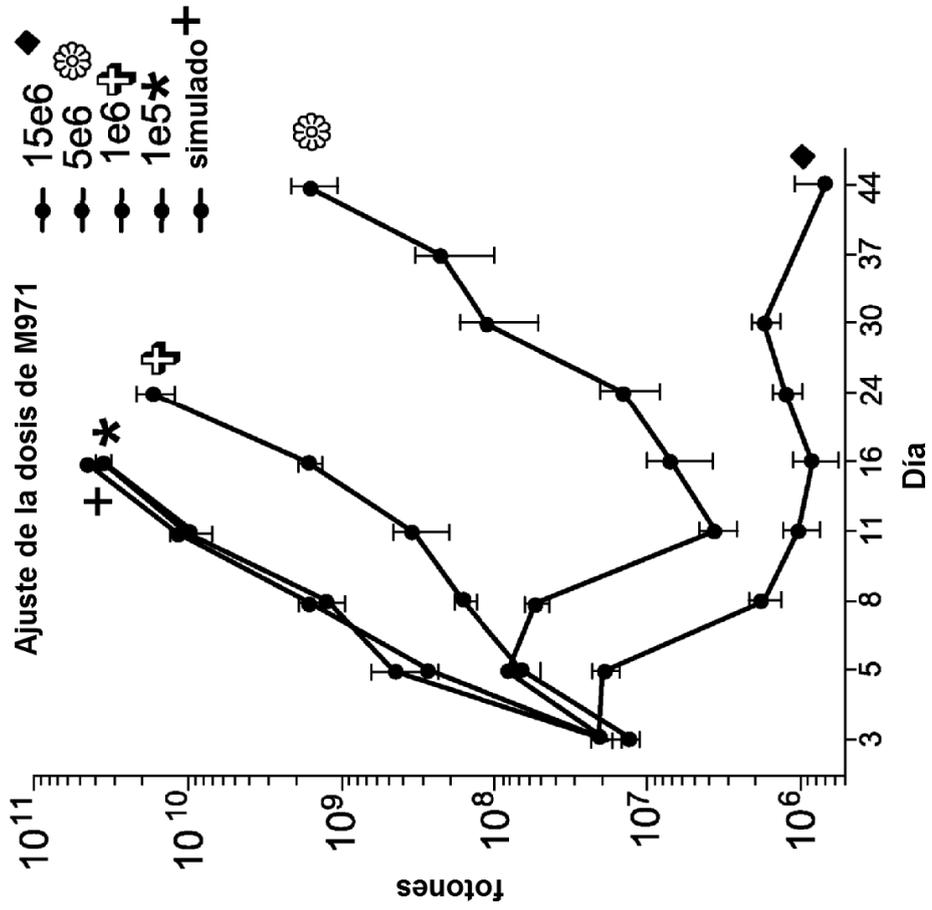


FIG. 6