

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 723 181**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2012 PCT/US2012/048543**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013 WO13019615**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2012 E 12820516 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2736540**

54 Título: **Receptores de conmutación coestimulante**

30 Prioridad:

29.07.2011 US 201161513259 P

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

22.08.2019

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (100.0%)
Center for Technology Transfer, 3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia, PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

**JUNE, CARL, H. y
ZHAO, YANGBING**

74 Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

ES 2 723 181 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 conmutación coestimulante

5 Antecedentes de la invención

El principio general del sistema inmunitario es que las células T perciben su microentorno, y entonces o se activan o se inhiben, dependiendo de las señales que perciben. La familia genética CD28 está comprendida por 2 genes que transmiten señales positivas, CD28 e ICOS, y 3 genes que suministran señales negativas: CTLA4, PD-1 y BTLA (Riley et al., 2005, Blood 105:13-21). Los ligandos para el PD-1 son PDL1 y PDL2. Se sabe bien que los ligandos de PD-1 a menudo se expresan en el microentorno tumoral, y que la unión de PD-1 con PDL1 y PDL2 en las células T puede dar lugar a la inactivación de las células T.

En este momento la única estrategia para evitar el suministro de señales negativas de los ligandos de PD-1 o BTLA es la administración de anticuerpos antagonistas o proteínas de fusión que se unen a PD-1 o BTLA, es una estrategia que se está ensayando actualmente en ensayos de fase temprana (Cheever et al., 2008, Immunol Rev 222:357-68). Otra estrategia sería administrar compuestos de molécula pequeña que puedan inhibir la transducción de la señal de PD-1 o la transducción de la señal de BTLA. Las estrategias actuales para evitar la inactivación de células T por PD-1 es administrar un tratamiento sistémico al paciente con anticuerpos antagonistas del PD-1.

Ambas estrategias tienen limitaciones porque se impide que las células T que residen en el microentorno tumoral así como en el sistema inmunitario completo se inactiven por el tratamiento sistémico, y se espera que esto dé lugar a síndromes inflamatorios sistémicos o autoinmunitarios en algunos pacientes (Beck et al., 2006, J Clin Oncol 24:2283-9; Blansfield et al., 2005, J Immunother 28:593-8; Dougan et al., 2009, Annual Review of Immunology 27:83-117).

El documento Dennehy et al. (2006), J. Immunol., 176:5725-5729, describe que la monovalencia de CD28 mantiene la dependencia de antígeno de las respuestas coestimulantes de células T.

El documento WO 2005/044996 A2 describe receptores quiméricos con un dominio 4-1BB de señalización estimulante.

El documento Barrett et al. (2010), Abstract 2933, Cancer Research, 70 (Suplemento 8), 2933, describe un modelo preclínico de erradicación de leucemia de células B con células T modificadas con un inmunorreceptor quimérico anti-CD19 quimérico transducido lentivíricamente.

Por lo tanto, existe una necesidad urgente en la técnica de composiciones y métodos para una forma eficaz de terapia adoptiva. La presente invención afronta esta necesidad.

40 Sumario de la invención

La materia objeto de la invención es como se expone en las reivindicaciones. En un aspecto, la invención proporciona una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular que comprende un primer dominio asociado con una señal negativa y un dominio intracelular que comprende un segundo dominio asociado con una señal positiva, en el que dichos primer dominio y segundo dominios se seleccionan respectivamente de entre el grupo que consiste en BTLA y CD28, BTLA y CD27, BTLA e ICOS, PD-1 y CD28, PD-1 e ICOS y PD-1 y CD27, y en el que dicha proteína de fusión es capaz de conmutar una señal negativa en una señal positiva para aumentar una respuesta inmunitaria.

El primer dominio es al menos una parte del dominio extracelular del polipéptido que se asocia con una señal negativa y el segundo dominios es al menos una parte del dominio intracelular del polipéptido que se asocia con una señal positiva.

En una realización, la proteína de fusión comprende adicionalmente un dominio transmembrana. En otra realización. El dominio transmembrana es el dominio transmembrana del polipéptido que se asocia con una señal negativa o el dominio transmembrana del polipéptido que se asocia con una señal positiva.

El polipéptido que se asocia con una señal negativa se selecciona de entre el grupo que consiste en CTLA4, PD-1 y BTLA.

El polipéptido que se asocia con una señal positiva se selecciona de entre el grupo que consiste en CD28 e ICOS.

La invención también proporciona una célula modificada para que exprese una proteína de fusión como se ha expuesto anteriormente.

En una realización. La célula comprende adicionalmente un receptor de antígeno quimérico (CAR), en el que el CAR

comprende un dominio de reconocimiento del antígeno de un anticuerpo específico y un dominio intracelular de la cadena CD3-zeta. En una realización, el dominio de reconocimiento del antígeno se une específicamente a CD19.

5 La invención también proporciona un vector que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión anterior.

10 La invención también proporciona una célula T modificada genéticamente para expresar una proteína de fusión para su uso en un método de tratamiento del cáncer, en el que dicha proteína de fusión comprende un primer dominio asociado con una señal negativa y un segundo dominio asociado con una señal positiva, en el que dichos primer dominio y segundo dominio se seleccionan respectivamente de entre el grupo que consiste en BTLA y CD28, BTLA y CD27, BTLA e ICOS, PD-1 y CD28, PD-1 e ICOS y PD-1 y CD27, y en el que dicha proteína de fusión es capaz de conmutar una señal negativa en una señal positiva para aumentar una respuesta inmunitaria.

15 En una realización, la célula T adicionalmente se modifica genéticamente para que exprese un CAR, en el que el CAR comprende un dominio de reconocimiento del antígeno de un anticuerpo específico y un dominio extracelular de la cadena CD3-zeta.

En una realización, la célula T es una célula T autóloga.

20 Breve descripción de los dibujos

La siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención se entenderán mejor cuando se lean en conjunción con los dibujos adjuntos. Con el fin de ilustrar la invención, se muestran en los dibujos realizaciones que son actualmente preferidas. Se debería entender, sin embargo, que la invención no se limita a las disposiciones precisas e instrumentalidades de las realizaciones que se muestran en los dibujos.

30 La Figura 1, que comprende las Figuras 1A a 1C, es una serie de imágenes que demuestran que la señal de BTLA puede convertirse en otras señales en forma de un receptor co-estimulante quimérico (CCR) o al que se hace referencia de otra manera como receptor de conmutación. La Figura 1A es una imagen que representa una representación esquemática de receptores de conmutación quiméricos. La Figura 1B es una imagen que demuestra que la expresión en superficie de BTLA era detectada por la proteína de fusión HVEM-Fc en diferentes momentos como se indica. La Figura 1C es una imagen que representa la IL-2 producida por las células T electroporadas que se estimulaban con el ligando de BTLA de la línea celular negativa (KTPloCD86A2) o el ligando HVEM de BTLA de la línea celular positiva (KTPloCD86A2 HVEM). Veinticuatro horas después de la estimulación, se ensayó la producción de IL por ELISA. Los resultados demostraban que fusionando el dominio BTLA extracelular con los dominios intracelulares de ICOS y CD3-zeta, las células T se podían activar por estimulación de la línea celular que expresa el ligando HVEM de BTLA, indicando que la señal de BTLA podía convertirse en otras señales en forma de un receptor co-estimulante quimérico.

40 La Figura 2, que comprende las Figuras 2A a 2C, es una serie de imágenes que demuestran que la señal de BTLA puede convertirse en señal CD28 mediante un CCR BTLA-CD28.

45 La Figura 3, que comprende las Figuras 3A y 3B, es una serie de imágenes que demuestran que la señal de BTLA puede convertirse en una señal ICOS mediante un CCR BTLA-ICOS. Los resultados demuestran que la señal de ICOS convertida por BTLA-ICOS aumenta la producción de células Th17.

La Figura 4, que comprende las Figuras 4A a 4D, es una serie de imágenes que demuestran que las señales de PD-1 pueden convertirse en señales CD28.

50 La Figura 5, que comprende las Figuras 5A y 5C, es una serie de imágenes que demuestran la reversión de la inhibición de la señal de PD-1 mediante la co-introducción de un CCR PD1-CD28.

La Figura 6, que comprende las Figuras 6A a 6C, es una serie de imágenes que demuestran la conversión de la señal de PD1 en la señal ICOS.

55 La Figura 7, es una imagen que demuestra que el efecto de PD1 de ts sobre la producción de citocinas se rescata por las construcciones quiméricas de PD1.

60 La Figura 8, es una imagen que demuestra que los receptores quiméricos de PD-1 no afectan la producción de granzima B.

La Figura 9 es una imagen que demuestra que se observaban mínimas diferencias en la actividad destructora de células T CD8 en presencia o ausencia de PD1.

65 La Figura 10 es una imagen que muestra el efecto de los receptores quiméricos de PD-1 sobre la proliferación de células T.

La Figura 11 es una imagen que muestra que el receptor quimérico PD1-CD28 aumenta el número de células T CD8.

Descripción detallada

5 La presente invención se refiere en general a una proteína de fusión receptora que cuando se presenta en una célula puede convertir una señal negativa en una señal positiva para la célula. La proteína de fusión es una proteína quimérica ya que la proteína comprende al menos dos dominios, en la que el primer dominio es un polipéptido que se asocia con una señal negativa y el segundo dominio es un polipéptido que se asocia con una señal positiva. En
10 una realización, el primer dominio se une a un factor inhibidor y activa la proteína de fusión, en la que la señal se envía mediante el segundo dominio que da como resultado una señal positiva transmitida a la célula. De esta manera, la proteína de fusión es capaz de convertir una señal de otra manera negativa en una señal positiva en la célula. Por lo tanto, la invención puede considerarse como que engloba receptores de conmutación que son capaces de conmutar señales negativas en señales positivas para el aumento de una respuesta inmunitaria. El aumento de
15 una respuesta inmunitaria puede tratar una enfermedad asociada con una respuesta inmunitaria inadecuada.

La invención se basa en el descubrimiento de que las células T se pueden modificar para que expresen un receptor de conmutación con el fin de aprovechar el hecho de que las células T son capaces de percibir su microentorno para activarse o inhibirse dependiendo de las señales que perciben. Por ejemplo, la presente invención aprovecha el
20 hecho de que hay ligandos presentes en el microentorno tumoral que inhiben la actividad de las células T. Las células T se modifican para que expresen un receptor de conmutación en el que el primer dominio es capaz de activarse por los ligandos inhibidores del microentorno tumoral y conmutan la señal de otra manera inhibidora en una señal positiva para la célula T por medio de la señalización mediante el segundo dominio del receptor de conmutación. Por lo tanto, la invención proporciona célula T para su uso en una terapia específica, que proporciona un índice terapéutico mejorado con menos toxicidad, así como la capacidad para proporcionar un tratamiento de una
25 vez que es eficaz, y evita la necesidad de la administración continua de anticuerpos.

En algunos casos, las células se modifican genéticamente antes de administrarlas a un paciente que las necesite. Preferentemente, la célula se puede modificar genéticamente para que exprese establemente un receptor de conmutación deseado de la invención. En otros casos, las células se pueden modificar adicionalmente para que expresen un dominio de unión a un anticuerpo en su superficie, confiriendo una nueva especificidad antigénica que es independiente del MHC (por ejemplo, receptores antigénicos quiméricos (CAR)). El CAR combina un dominio de reconocimiento antigénico de un anticuerpo específico con un dominio intracelular de la cadena CD3-zeta o proteína FcγRI en una proteína quimérica única. En este contexto, la célula se modifica para que exprese un receptor de conmutador y un CAR.
30
35

Las células modificadas de la invención son capaces de replicarse *in vivo* dando como resultado su persistencia a largo plazo lo que puede dar lugar a un control tumoral sostenido.

40 La presente invención desvela adicionalmente métodos para producir los presentes receptores de conmutación, y los métodos para utilizar estos receptores de conmutación en el estudio y tratamiento del cáncer.

Definiciones

45 A menos de que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habituado en la técnica a la que la invención pertenece. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica para el ensayo de la presente invención, se describen en el presente documento los materiales y métodos preferidos. En la descripción y reivindicación de la presente invención, se utilizará la
50 siguiente terminología.

También se tiene que entender que la terminología utilizada en el presente documento solamente tiene el propósito de describir realizaciones particulares, y no pretende ser limitante.

55 Los artículos “un” y “una” se utiliza en el presente documento para hacer referencia a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

60 “Aproximadamente” como se utiliza en el presente documento cuando se hace referencia a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, significa que engloba las variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferentemente $\pm 5\%$, incluso más preferentemente $\pm 1\%$, y aún más preferentemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, y dichas variaciones son apropiadas para llevar a cabo los métodos desvelados.

65 El término “anticuerpo”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente con un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y pueden ser partes inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas.

Los anticuerpos son normalmente tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos en la presente invención pueden existir en una variedad de formas incluyendo, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, Fc, Fab, y F(ab')₂, así como anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos humanizados (Harlow et al., 1999, En: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426).

El término “antígeno” o “Ag” como se utiliza en el presente documento se define como una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar la producción de anticuerpos o la activación de células inmunológicamente competentes, o ambas. El experto entenderá que cualquier macromolécula, incluyendo virtualmente todas las proteínas o péptidos, pueden servir como antígeno. Además, los antígenos se pueden derivar de ADN recombinante o genómico. Un experto en la técnica entenderá que cualquier ADN, que comprende una secuencia de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos parcial que codifica una proteína que desencadena una respuesta inmunitaria codifica, por lo tanto, un “antígeno” como el término que se utiliza en el presente documento. Además, un experto en la técnica entenderá que un antígeno no necesariamente se codifica solo por una secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen. Es fácilmente evidente que la presente invención incluye, pero no se limita a, el uso de secuencias de nucleótidos parciales de más de un gen y que estas secuencias de nucleótidos están dispuestas en distintas combinaciones para dar lugar a la respuesta inmunitaria deseada. Además, un experto en la técnica entenderá que un antígeno no necesariamente se codifica por un “gen” para nada. Es fácilmente evidente que un antígeno puede ser generado, sintetizado o se puede derivar de una muestra biológica. Dicha muestra biológica puede incluir, pero no se limita a, una muestra tumoral, una célula o un fluido biológico.

La expresión “efecto antitumoral” como se utiliza en el presente documento, se refiere a un efecto biológica que se puede manifestar por una disminución del volumen tumoral, una disminución del número de células tumorales, una disminución del número de metástasis, un aumento de la expectativa de vida, o una mejora de distintos síntomas fisiológicos asociados con la afección cancerosa. Un “efecto antitumoral” también se puede manifestar por la capacidad de los péptidos, polinucleótidos, células y anticuerpos de la invención para la prevención de la existencia de un tumor en el primer lugar.

Como se utiliza en el presente documento., el término “autólogo” se puede utilizar para referirse a cualquier material derivado del mismo individuo que el individuo al que se reintroduce más tarde.

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

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

Como se utiliza en el presente documento, “biológicamente activo o inmunológicamente activo” se refiere a proteínas de fusión de acuerdo con la presente invención que tienen una función estructural similar (per no necesariamente del mismo grado), y/o una función reguladora similar(pero no necesariamente en el mismo grado) y/o una función bioquímica similar (pero no necesariamente del mismo grado) y/o actividad inmunológica, (pero no necesariamente en el mismo grado) que una proteína individual de tipo silvestre que están en los bloques que construyen las proteínas de fusión de la presente invención.

El término “cáncer” como se utiliza en el presente documento se define como una enfermedad caracterizada por el rápido y desenfrenado crecimiento de células aberrantes. Las células cancerosas se pueden diseminar localmente o a través de la corriente sanguínea y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. Ejemplos de distintos cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer cerebral, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y similares.

“Proteína quimérica” quiere decir cualquier unidad polipeptídica única que comprende dos dominios polipeptídicos distintos, donde los dos dominios no son de origen natural en la misma unidad polipeptídica. Normalmente, dichas proteínas quiméricas se producen por la expresión de una construcción de ADNc, pero se podrían producir por métodos de síntesis proteica conocidos en la técnica.

El término “derivado” como se utiliza en el presente documento en relación con la secuencia de aminoácidos significa la modificación química de una proteína de fusión de la invención.

“Codificante” se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido tal como un gen, un ADNc, o una ARNm, que sirve como matriz para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia de nucleótidos definida (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y a las propiedades biológicas que resultan de estos. Por lo tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y traducción del ARNm correspondiente a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto a la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y se proporciona habitualmente en el listado de secuencias, como a la cadena no codificante, que se utiliza como matriz para la transcripción de un gen o ADNc, se puede hacer referencia como codificante de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

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

5 "Cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se utilizan de manera intercambiable en el presente documento, y se refiere a una cantidad de un compuesto, formulación, material o composición, como se describe en el presente documento eficaz para conseguir un resultado biológico particular. Dichos resultados pueden incluir, pero no se limitan a, la inhibición de la infección vírica como se determina por cualquier medio adecuado en la técnica.

10 Como se utiliza en el presente documento "endógeno" se refiere a cualquier material de o producido den un organismo, células, tejidos o sistemas.

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

15 El término "expresión" como se utiliza en el presente documento se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de un nucleótido particular dirigido por su promotor.

20 "Vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende las secuencias de control de la expresión unidas operativamente a una secuencia de nucleótidos que se van a expresar. Un vector de expresión comprende suficientes elementos cis-actuantes para la expresión; otros elementos para la expresión se pueden suministrar por una célula huésped o en un sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos los que se conocen en la técnica, tal como cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudo o contenido en liposomas) y virus (por ejemplo, lentivirus, retrovirus, adenovirus, y virus adeno-asociados) que incorpora el polinucleótido recombinante.

25 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "proteínas de fusión" se refiere a proteínas quiméricas que comprenden secuencias de aminoácidos de dos o más proteínas diferentes. Normalmente, las proteínas de fusión resultan de técnicas de recombinantes *in vitro* bien conocidas en la técnica.

30 "Homólogo" como se utiliza en el presente documento, se refiere a la identidad de una subunidad de secuencia entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas polipeptídicas, tal como, dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN o entre dos moléculas polipeptídicas. Cuando una posición de la subunidad en ambas de las dos moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica, por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de coincidencias o posiciones homólogas; por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, de cinco posiciones en un polímero de diez unidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias son homólogas, las dos secuencias son un 50 % homólogas; si el 90 % de las posiciones (por ejemplo, 9 de 10), coinciden o son homólogas, las dos secuencias son un 90 % homólogas.

40 La expresión "reacción inmunitaria" como se utiliza en el presente documento, significa el resultado detectable de la estimulación y/o activación de una célula inmunitaria.

45 Como se utiliza la expresión "respuesta inmunitaria" en el presente documento, significa un proceso que da como resultado la activación y/o invocación de una función efectora en las células T, células B, células asesinas naturales (NK), y/o células presentadoras de antígeno. Por lo tanto, una respuesta inmunitaria, como entendería un experto incluye, pero no se limita a, cualquier activación específica de antígeno detectable o alogénica de una respuesta de célula T auxiliar o célula T asesina, producción de anticuerpos, activación de reacciones alérgicas mediadas por células T, y similares.

50 La expresión "célula inmunitaria" como se utiliza en el presente documento, significa cualquier célula implicada en el montaje de una respuesta inmunitaria. Dichas células incluyen, pero no se limitan a, células T, células B, células NK, células presentadoras de antígeno, y similares.

55 Como se utiliza en el presente documento, un "material de instrucciones" incluye una publicación, un registro, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que se puede utilizar para comunicar la utilizada de las composiciones y métodos de la invención. El material de instrucciones del kit de la invención puede estar, por ejemplo, fijado en el envase que contiene el ácido nucleico, péptido, y/o composición de la invención o envasarse junto con un recipiente que contenga el ácido nucleico, péptido y/o composición. De manera alternativa, el material de instrucciones se puede envasar por separado del recipiente con la intención de que el material de instrucciones y el compuesto se utilicen de manera cooperativa por el receptor.

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

ejemplo, una célula huésped.

En el contexto de la presente invención, se utilizan las siguientes abreviaturas para las bases de ácido nucleico de origen natural. "A" se refiere a adenosina, "C" se refiere a citosina, "G" se refiere a guanosina, "T" se refiere a timidina, y "U" se refiere a uridina.

A menos de que se especifique otra cosa, una "secuencia de nucleótido que codifica una secuencia de aminoácido" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas de estas y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La frase secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o un ARN también puede incluir los intrones hasta el punto de que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede en alguna versión contener un intrón(es).

Un "lentivirus" como se utiliza en el presente documento, se refiere a un género de la familia Retroviridae. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus porque son capaces de infectar celular que no están en división; pueden suministrar una cantidad significativa de información genética en el ADN de la célula huésped, por lo que son uno de los métodos más eficaces de suministro genético por vector. El VIH, SIV y FIV son ejemplos de lentivirus. Los vectores derivados de lentivirus ofrecen el medio para conseguir niveles significativos de transferencia genética *in vivo*.

El término "modulación" de una respuesta inmunitaria, como se utiliza en el presente documento, significa la mediación en un aumento o disminución detectable del nivel de una respuesta inmunitaria en un mamífero en comparación con el nivel de respuesta inmunitaria en el mamífero y la ausencia de un tratamiento o compuesto, y/o en comparación con el nivel de una respuesta inmunitaria de otro animal sin tratar por lo demás idéntico. El término engloba la perturbación y/o alteración de una señal o respuesta nativa por la que se mediatiza una respuesta terapéutica beneficiosa en un mamífero, preferentemente, un ser humano.

Una "señal negativa", como se utiliza en el presente documento, significa una señal que induce la típica cascada de eventos intracelulares asociados, entre otras cosas, con la disminución de la proliferación, disminución de activación, disminución de procesamiento celular, y similares.

Una "señal positiva", como se utiliza en el presente documento, significa una señal que induce la típica cascada de eventos intracelulares asociada, entre otras cosas, con el aumento de la proliferación, aumento de activación, aumento de procesamiento celular, y similares.

La expresión "unido operativamente" se refiere a la unión funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácido nucleico heteróloga que da como resultado la expresión de esta última. Por ejemplo, una primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico está colocada en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente con una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. En general, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas, y cuando es necesario unir dos regiones codificantes proteicas, están en la misma marco de lectura.

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

El término "polinucleótidos" como se utiliza en el presente documento se define como una cadena de nucleótidos. Además, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. Por lo tanto, ácidos nucleicos y polinucleótidos se utilizan en el presente documento de manera intercambiable. Un experto en la técnica tiene el conocimiento general de que los ácidos nucleicos son polinucleótidos que se pueden hidrolizar en "nucleótidos" monoméricos. Los "nucleótidos" monoméricos se pueden hidrolizar en nucleósidos. Como se utiliza en el presente documento los polinucleótidos incluyen, pero no se limitan a, todas las secuencias de ácido nucleico que se obtengan por cualquier medio disponible en la técnica incluyendo, sin limitación, medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácido nucleico a partir de una biblioteca recombinante o un genoma celular, utilizando una tecnología de clonación habitual y una PCRTM, y similares, y por medios sintéticos.

Como se utiliza en el presente documento, los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se utilizan de manera intercambiable, y se refiere a un compuesto comprendido por restos de aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos, y no tiene limitación sobre el número máximo de aminoácidos que pueden comprender una secuencia proteica o peptídica. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre ellos por enlaces peptídicos. Como se utiliza en el presente documento, el término se refiere a cadenas cortas a las que se hace referencia comúnmente en la técnica como péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, y a cadenas largas, a las que se hace referencia en la técnica en general como proteínas, de las que hay muchos tipos. "Polipéptidos" incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, sustancialmente homólogos de polipéptidos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Los polipéptidos incluyen péptidos naturales, péptidos

recombinantes, péptidos sintéticos o una combinación de los mismos.

5 El término “promotor” como se utiliza en el presente documento se define como una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o una maquinaria sintética introducida, necesaria para iniciar la transcripción específica de una secuencia de polinucleótido.

10 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “secuencia promotora/reguladora” significa una secuencia de ácido nucleico que es necesaria para la expresión de un producto genético unida operativamente a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora central y en otros casos, esta secuencia puede incluir también una secuencia amplificadora y otros elementos reguladores que son necesarios para la expresión del producto genético. La secuencia promotora/reguladora puede, por ejemplo, ser la que exprese el producto genético de una manera específica del tejido.

15 Un promotor “constitutivo” es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente a un polinucleótido que codifica o especifica un producto genético, hace que el producto genético se produzca en una célula en la mayoría o todas las condiciones fisiológicas de la célula.

20 Un promotor “inducible” es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto genético, hace que el producto genético se produzca que una célula sustancialmente solo cuando está presente en la célula un inductor que se corresponde con el promotor.

25 Un promotor “específico de tejido” es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente con un polinucleótido que codifica o se especifica por un gen, hace que el producto genético se produzca en una célula sustancialmente solo si la célula es una célula del tipo de tejido correspondiente al promotor.

El término “sujeto” tiene la intención de incluir organismos vivos en los que se puede desencadenar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, los mamíferos).

30 Como se utiliza en el presente documento, una célula “sustancialmente purificada” es una célula que está esencialmente libre de otros tipos de células. Una célula sustancialmente purificada también se refiere a una célula que se ha separado de otros tipos de células con los que se asocia normalmente en su estado de origen natural. En algunos casos, una población de células sustancialmente purificadas se refiere a una población homogénea de células. En otros casos, esta expresión se refiere simplemente a una célula que se ha separado de las células con las que se asocia naturalmente en su estado natural. En algunas realizaciones, las células se cultivan *in vitro*. En otras realizaciones, las células no se cultivan *in vitro*.

El término “terapéutico” como se utiliza en el presente documento significa un tratamiento y/o profilaxis. Un efecto terapéutico se obtiene por supresión, remisión o erradicación de un estado de enfermedad.

40 El término “transfectado” o “transformado” o “transducido” como se utiliza en el presente documento se refiere a un procedimiento por el que se transfiere o introduce un ácido nucleico exógeno. Una célula “transfectada” o “transformada” o “transducida” es una que se ha transfectado, transformado o transducido con un ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula como sujeto primario y su progenie.

45 La frase “bajo el control transcripcional” o “unido operativamente” como se utiliza en el presente documento significa que el promotor está en la localización y orientación correcta en relación a un polinucleótido para controlar el inicio de la transcripción por una ARN polimerasa y la expresión del polinucleótido.

50 Un “vector” es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que se puede utilizar para suministrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. Se conocen en la técnica numerosos vectores que incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfifílicos, plásmidos y virus. Por lo tanto, el término “vector” incluye un plásmido o un virus replicante de manera autónoma. El término también se debería considerar que incluye compuestos o plasmídicos o no víricos que faciliten la transferencia de un ácido nucleico en las células, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas, y similares. Ejemplos de vectores víricos incluyen, pero no se limitan a, vectores adenovíricos, vectores de virus adeno-asociados, vectores retrovíricos y similares.

60 El término “estimulación” significa una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimulante (por ejemplo, un complejo TCR/CD3) con su ligando equivalente mediando de esta manera un evento de transducción de una señal, tal como, pero sin limitarse a, la señal de transducción mediante el complejo TCR/CD3. La estimulación puede mediar en la expresión alterada de ciertas moléculas, tales como la regulación negativa de TGF- β , y/o la reorganización de estructuras del citoesqueleto, y similares.

65 “Activación” como se utiliza en el presente documento se refiere al estado de una célula T que se ha estimulado suficientemente para inducir una proliferación celular detectable. La activación se puede asociar también con la producción de citocinas inducida, y las funciones efectoras detectables. La expresión “células T activadas” se refiere

entre otras cosas, a las células T que están en división celular. La activación se puede asociar también con la generación de una respuesta inmunitaria (por ejemplo, de un mitógeno tal como ConA o PHA), regula positivamente de manera detectable marcadores de superficie, tales como CD25, es decir, el receptor de la IL-2, inicia la cascada de fosforilación que implica el p56lck, produce la liberación de citocinas e interleucinas, aumenta la síntesis de ADN que se puede evaluar entre otros métodos evaluando el nivel de incorporación de ³H-timidina en las cadenas de ADN nacientes, y produce que las células proliferen.

La expresión “se une específicamente” como se utiliza en el presente documento, significa un anticuerpo, o un ligando, que reconoce y se une a una pareja proteica de unión equivalente (por ejemplo, una molécula estimulante y/o coestimulante presente en una célula T) presente en una muestra, pero cuyo anticuerpo o ligando no reconoce o se une sustancialmente a otras moléculas en la muestra.

Intervalos: a lo largo de la presente divulgación, se pueden presentar distintos aspectos de la invención en un formato de intervalos. Se debería entender que la descripción en formato de intervalo es simplemente por conveniencia y brevedad y no se debería considerar como una limitación inflexible del alcance de la invención. En consecuencia, la descripción de un intervalo se debería considerar que desvela específicamente todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales de ese intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo tal como desde 1 a 6, se debería considerar que desvela específicamente subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como los números individuales en ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4,5, 5,3, y 6. Esto se aplica independientemente de la anchura del intervalo.

Descripción

La presente invención se refiere al descubrimiento de que se puede diseñar un receptor de conmutación quimérico para conmutar una transducción de señal en señal negativa en una señal positiva. En una realización, el receptor de conmutación es una proteína quimérica que comprende una primera proteína o fragmento de la misma asociada con una señal negativa y una segunda proteína o fragmento de la misma asociada con una señal positiva. Un ejemplo de proteína asociada con la señal negativa incluye, pero no se limita a CTLA-1, PD-1, BTLA, y similares. Un ejemplo de proteína asociada con una señal positiva incluye, pero no se limita a CD28, ICOS, y similares.

La invención se refiere, *i.a.*, a receptores de conmutación quiméricos y proteínas de fusión relacionadas.

En una realización, la invención proporciona una célula (por ejemplo, una célula T o una célula asesina natural) modificada para expresar un receptor de conmutación quimérico donde la célula modificada presenta una propiedad antitumoral. En algunos casos, la célula modificada también se modifica para que exprese un receptor antigénico quimérico (CAR). En algunos casos, la célula modificada de la invención presenta un aumento de la producción de IL-2 e IFN- γ . En algunos casos, la célula modificada de la invención está polarizada para secretar IL-17. Por lo tanto, la célula modificada de la invención cuando se infunde en un paciente puede eliminar células tumorales *in vivo* en el paciente.

Composiciones

La presente invención proporciona, en un aspecto, un receptor de conmutación que cuando se expresa en una célula convierte una señal negativa en una señal positiva en la célula. Por ejemplo, este receptor de conmutación tiene un primer dominio que comprende un polipéptido que suministra una señal negativa; y un segundo dominio que comprende un polipéptido que suministra una señal positiva.

Un polipéptido que tiene la capacidad de suministrar una señal negativa incluye, pero no se limita a CTLA4, PD-1, BTLA y similares.

Un polipéptido que tiene la capacidad de suministrar una señal positiva incluye, pero no se limita a ICOS, CD28, y similares.

Los primeros dominios adecuados en el contexto de un polipéptido que suministra una señal negativa incluyen, variantes o derivados del CTLA4 de tipo silvestre. Preferentemente, el primer dominio del receptor de conmutación de la presente divulgación es al menos una parte del dominio extracelular de la proteína CTLA, específicamente la parte del dominio extracelular que es necesario para la unión con el ligando natural del CTLA. Las variantes de la forma de tipo silvestre del dominio extracelular, o la parte del dominio extracelular desvelado responsable de la unión al ligando natural de CTLA, también se desvelan en la presente solicitud, a condición de que la variante proporcione un nivel similar de actividad biológica que la proteína de tipo silvestre.

Los primeros dominios adecuados en el contexto de un polipéptido que suministra una señal negativa incluyen, variantes o derivados del PD-1 de tipo silvestre. Preferentemente, el primer dominio del receptor de conmutación de la presente divulgación es al menos una parte del dominio extracelular de la proteína PD-1, específicamente la parte del dominio extracelular que es necesario para la unión con el ligando natural del PD-1. Las variantes de la forma de tipo silvestre del dominio extracelular, o la parte del dominio extracelular desvelado responsable de la unión al

ligando natural de PD-1, también se desvelan en la presente solicitud, a condición de que la variante proporcione un nivel similar de actividad biológica que la proteína de tipo silvestre.

5 Los primeros dominios adecuados en el contexto de un polipéptido que suministra una señal negativa incluyen, variantes o derivados del BTLA de tipo silvestre. Preferentemente, el primer dominio del receptor de conmutación de la presente divulgación es al menos una parte del dominio extracelular de la proteína BTLA, específicamente la parte del dominio extracelular que es necesario para la unión con el ligando natural del BTLA. Las variantes de la forma de tipo silvestre del dominio extracelular, o la parte del dominio extracelular desvelado responsable de la unión al ligando natural de BTLA, también se desvelan en la presente solicitud, a condición de que la variante proporcione un nivel similar de actividad biológica que la proteína de tipo silvestre.

15 Los segundos dominios adecuados en el contexto de un polipéptido que suministra una señal positiva incluye, variantes o derivados de la proteína ICOS. Preferentemente, el segundo dominio del receptor de conmutación en esta realización es al menos una parte del dominio intracelular (al que se hace referencia también como endodominio) de la proteína ICOS, específicamente la parte que es necesaria para desencadenar una señal para los componentes intracelulares de la célula. Las variantes de la forma de tipo silvestre del dominio intracelular de la proteína ICOS, o la parte del dominio intracelular responsable de la señalización, también se incluyen en la presente invención, a condición de que la variante proporcione un nivel similar de actividad biológica que la proteína de tipo silvestre.

20 Los segundos dominios adecuados en el contexto de un polipéptido que suministra una señal positiva incluye, variantes o derivados de la proteína CD28. Preferentemente, el segundo dominio del receptor de conmutación en esta realización es al menos una parte del dominio intracelular (al que se hace referencia también como endodominio) de la proteína CD28, específicamente la parte que es necesaria para desencadenar una señal para los componentes intracelulares de la célula. Las variantes de la forma de tipo silvestre del dominio intracelular de la proteína CD28, o la parte del dominio intracelular responsable de la señalización, también se incluyen en la presente invención, a condición de que la variante proporcione un nivel similar de actividad biológica que la proteína de tipo silvestre.

30 El receptor de conmutación de la invención comprende un polipéptido que se corresponde con un dominio citoplásmico, transmembrana y extracelular, así como polipéptido que se corresponden con partes más pequeñas del dominio citoplásmico, transmembrana y extracelular. En una realización el receptor de conmutación comprende el dominio transmembrana del primer polipéptido que suministra una señal negativa. En otra realización, el receptor de conmutación comprende el dominio transmembrana del segundo polipéptido que suministra una señal positiva.

35 De acuerdo con la presente invención, el primer polipéptido que suministra un componente de señal negativa de cualquiera de los receptores de conmutación es BTLA o PD-1.

40 En una divulgación adicional más de la presente solicitud, el primer polipéptido que suministra un componente de señal negativa de cualquiera de los receptores de conmutación descritos en el presente documento se puede sustituir con otra proteína inhibidora, es decir, una proteína que evita la activación de una respuesta inmunitaria y/o induce apoptosis en las células T u otros tipos celulares, tales como las células B, células asesinas naturales (NK), células T NK, células linfoides progenitoras, células dendríticas, monocitos/macrófagos, células de un linaje de macrófagos basado en tejidos con capacidad de presentación de antígenos, y cualquiera de varias células presentadoras de antígeno no profesionales, por ejemplo, células endoteliales. Ejemplos de proteínas inhibidoras incluyen, pero no se limitan a CTLA-4, CD160, CD161, y CD94; LAG-3 y CD244 (véase, 2011, Wherry, Nat Immunol. 131:492-9).

50 De acuerdo con una realización de la presente invención, la unión del primer polipéptido que suministra una señal negativa del receptor de conmutación con su ligando correspondiente da como resultado la activación del segundo polipéptido que suministra una señal positiva del receptor de conmutación. De esta manera, una señal negativa se puede convertir en una señal positiva. Es decir, el primer polipéptido del receptor de conmutación de la presente invención puede desencadenar una ruta de señalización intracelular de manera que la activación del segundo polipéptido de la invención da como resultado la conversión de la señal negativa en una señal positiva. Por lo tanto, una característica única del primer polipéptido del receptor de conmutación de la presente invención es que convierte una señal trans natural que resultaría naturalmente en una señal negativa para la célula en una señal positiva que induce que la célula presente características antitumorales.

De acuerdo con la presente invención, el segundo polipéptido que envía una señal positiva o una señal activadora es CD28, CD27 o ICOS.

60 El segundo polipéptido puede ser una proteína que envía una señal positiva o una señal activadora. Un ejemplo preferido del segundo polipéptido desvelado en el presente documento incluye, pero no se limita a CD37 (4-1BB) o TCRzeta.

65 En una realización, la invención se aprovecha de los microentornos donde hay un gran número de ligandos o proteínas que inhiben el sistema inmunitario donde la inhibición del sistema inmunitario da como resultado un estado de enfermedad inmunitario no deseado. Es decir, el receptor de conmutación se puede modificar para que

comprenda un primer dominio que se una al factor inhibidor de inmunidad en el microentorno y convierte la señal normalmente asociada con el factor inhibidor de inmunidad en una señal positiva donde la señal positiva activa la célula para que presente una respuesta inmunitaria aumentada.

5 Una proteína quimérica preferida de la presente invención es BTLA:ICOS. La quimerización genética de las secuencias de BTLA con ICOS y la expresión recombinante da como resultado el “receptor de conmutación” quimérico BTLA:ICOS que demuestra características estructurales y funcionales atribuibles tanto a BTLA como a ICOS. Las células modificadas para que expresen BTLA:ICOS pueden redirigir la señalización inhibitoria a una señal estimulante y de esta manera aumentar la función de la célula T. En algunos casos, las células están modificadas para que expresen el receptor de conmutación BTLA:ICOS en combinación con un CAR.

15 Otra proteína quimérica preferida de la presente invención es PD1:CD28. La quimerización genética de las secuencias de PD1 con CD28 y la expresión recombinante da como resultado el “receptor de conmutación” quimérico PD1:CD28 que demuestra características estructurales y funcionales atribuibles tanto a PD1 como a CD28. Las células modificadas para que expresen PD1:CD28 pueden redirigir la señalización inhibitoria a una señal estimulante y de esta manera aumentar la función de la célula T. En algunos casos, las células están modificadas para que expresen el receptor de conmutación PD1:CD28 en combinación con un CAR.

20 Una proteína quimérica preferida de la presente invención es CTLA4:CD28. La quimerización genética de las secuencias de CTLA4 con CD28 y la expresión recombinante da como resultado el “receptor de conmutación” quimérico CTLA4:CD28 que demuestra características estructurales y funcionales atribuibles tanto a CTLA4 como a CD28. Las células modificadas para que expresen CTLA4:CD28 pueden redirigir la señalización inhibitoria a una señal estimulante y de esta manera aumentar la función de la célula T. En algunos casos, las células están modificadas para que expresen el receptor de conmutación CTLA4:CD28 en combinación con un CAR.

25 Las presentes proteínas pueden existir en numerosas formas. Por ejemplo, las presentes proteínas pueden estar en forma de un polipéptido lineal o ramificado. Las proteínas quiméricas lineales se pueden producir por una tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, se pueden ensamblar casetes de transcripción quiméricos utilizando un sitio de endonucleasa de restricción solapado o extensión solapada por corte y empalme basada en la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

30 Las proteínas quiméricas polipeptídicas ramificadas se pueden producir fácilmente por tecnología de péptido sintético ensamblado en armazón (TASP) (Mutter, Trends Biochem. Sci. 13:260-265 (1988)). Mediante este procedimiento, las unidades peptídicas se sintetizan por separado y se acoplan covalentemente a un vehículo multifuncional, tal como un péptido central, utilizando reactivos de acoplamiento químicos. Por ejemplo, un análogo de un decapeptido cíclico de gramicidina S, en el que dos segmentos de lámina beta antiparalelos (lys-ala-lys) se unen por dos vueltas beta, se pueden utilizar como un péptido central. Las estrategias de condensación de segmentos se pueden utilizar para unir la primera y segunda proteínas a grupos amino épsilon de las cuatro cadenas laterales de lisina.

40 Las presentes proteínas también pueden existir como dos o más proteínas separadas unidas por un puente, tal como un enlace químico. Por ejemplo, dos o más componentes proteicos se pueden unir covalentemente directamente entre ellas en estructuras ramificadas utilizando reactivos de entrecruzamiento químicos tal como ditiobis(succinimidilpropionato) (DSP). Mediante esta tecnología, por ejemplo, la primera y segunda proteínas se pueden unir directamente.

50 El primer y segundo polipéptidos particulares del receptor de conmutación quimérico (chimeric switch receptor) de la invención pueden variar dependiendo de la enfermedad que se vaya a tratar. Normalmente, por ejemplo, cuando se trata el cáncer o infecciones víricas, se utilizan segundos polipéptidos que estimulan las respuestas de las células inmunitarias. Cuando se tratan trastornos del sistema inmunitario donde existen respuestas inmunitarias patógenas, se utiliza un segundo polipéptido inhibitorio. Por lo tanto, para el cáncer y enfermedades víricas, se desean los receptores de conmutación que convierten señales inhibitorias a activantes de la activación inmunitaria. En este escenario, el segundo componente proteico inhibitorio de la inmunidad se puede dirigir a diferentes efectores inmunitarios patógenos, incluyendo células T, células B, células asesinas naturales, y células presentadoras de antígeno.

60 En consecuencia, la invención proporciona un receptor de conmutación que cuando se expresa en una célula convierte una señal positiva en una señal negativa en la célula. Por ejemplo, este receptor de conmutación contiene un primer dominio que comprende un polipéptido que suministra una señal positiva; y un segundo dominio que comprende un polipéptido que suministra una señal negativa en la célula.

Modificación genética

65 La presente invención engloba una célula (por ejemplo, una célula T) transducida con un vector lentivírico (LV). En una realización, el LV codifica el receptor de conmutación de la invención que comprende un primer dominio que comprende un polipéptido que suministra una señal negativa y un segundo dominio que comprende un polipéptido

que suministra una señal positiva.

En una realización, las células se pueden transducir adicionalmente con un LV que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que combina un dominio de reconocimiento del antígeno de un anticuerpo específico con un dominio intracelular de la cadena CD3-zeta o la proteína FcγRI en una proteína quimérica única.

5 Los vectores derivados de retrovirus tales como los lentivirus son herramientas adecuadas para conseguir una transferencia genética a largo plazo ya que permiten una integración estable a largo plazo de un transgén y su propagación en células hijas. Los vectores lentivíricos tienen una ventaja añadida sobre los vectores derivados de onco-retrovirus tales como los virus de leucemia murina ya que pueden transducir células que no proliferan, tal como
10 los hepatocitos. También tienen la ventaja añadida de su baja inmunogenicidad.

En resumen, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos de la invención se consigue normalmente uniendo operativamente un ácido nucleico que codifica el polipéptido deseado o partes del mismo con un promotor, e incorporando la construcción en un vector de expresión. Los vectores pueden ser adecuados para la replicación e
15 integración en eucariotas. Los vectores de clonación típicos contienen terminadores de la transcripción y la traducción, secuencias de inicio, y promotores útiles para la regulación de la expresión de la secuencia de ácido nucleico deseada.

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

Además, el vector de expresión se puede proporcionar a una célula en forma de vector vírico. La tecnología de vector vírico es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volúmenes 1-3 (3ª ed., Cold Spring Harbor Press, NY 2001), y en otros manuales de virología y biología molecular. Los virus que son útiles como vectores incluyen, pero no se limitan a, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, herpesvirus, y lentivirus. En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, una secuencia promotora, sitios de endonucleasas de restricción convenientes, y uno o más marcadores genéticos (por ejemplo, los documentos WO 01/96584; WO 01/29058; y Pat de EE. UU. N.º 6.326.193).

Los elementos promotores adicionales, por ejemplo, los amplificadores, regulan la frecuencia de inicio transcripcional. Normalmente, se localizan en la región de 30-110 pb corriente arriba del sitio de inicio, aunque recientemente se ha demostrado que varios promotores contienen elementos funcionales corriente abajo del sitio de inicio también. El espacio entre los elementos promotores frecuentemente es flexible, de manera que la función del promotor se conserva cuando se invierten o se mueven los elementos unos con respecto a otros. En el promotor de la timidina cinasa (tk), el espacio entre los elementos promotores puede aumentarse hasta 50 pb antes de que comience a declinar la actividad. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden
40 funcionar cooperativamente o independientemente para activar la transcripción.

Un ejemplo de un promotor es la secuencia de promotor de citomegalovirus (CMV) temprano inmediato. Esta secuencia de promotor es una secuencia promotora constitutiva fuerte capaz de dirigir altos niveles de expresión de cualquier secuencia de polinucleótido unida operativamente a este. Sin embargo, se podrían utilizar otras secuencias promotoras constitutivas, incluyendo, pero sin limitarse al promotor temprano del virus de simio 40 (SV40), virus del tumor mamario de ratón (MMTV), promotor repetido terminal largo (Long Terminal Repeat, LTR) del virus de inmunodeficiencia humano (VIH), promotor MoMuV, un promotor de virus de leucemia aviar, un promotor temprano inmediato del virus de Epstein-Barr, un promotor del virus del sarcoma de Rous, así como promotores genéticos humanos tales como, pero sin limitarse a, el promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor de hemoglobina, y el promotor de creatina cinasa. Además, la invención no debería limitarse al uso de promotores constitutivos. Los promotores inducibles también se contemplan como parte de la invención. El uso de un promotor inducible proporciona una conmutación molecular capaz de activar la expresión de la secuencia de polinucleótido que está unido operativamente, cuya expresión se dese, o inactivar la expresión cuando la expresión no se dese. Ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, un promotor de metalotioneína, un promotor de glucocorticoide, un promotor de progesterona, y un promotor de tetraciclina.

Con el fin de evaluar la expresión de un polipéptido CAR o partes del mismo, el vector de expresión que se va a introducir en una célula también puede contener un gen marcador de selección o un gen indicador o ambos para facilitar la identificación y selección de las células que expresan de entre la población de células que se desea transfectar o infectar mediante vectores víricos. En otros aspectos, el marcador de selección puede llevarse a cabo en una pieza de ADN separado y utilizarse en un procedimiento de co-transfección. Ambos marcadores de selección y genes indicadores pueden estar flanqueados con secuencias reguladoras apropiadas para hacer posible la expresión en las células huésped. Los marcadores de selección útiles incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos, tal como neo y similares.

65 Los genes indicadores se utilizan para la identificación de células potencialmente transfectadas y para la evaluación

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

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

Los métodos físicos para introducir un polinucleótido en una célula huésped incluyen la precipitación en fosfato cálcico, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación, y similares. Los métodos para la producción de células que comprenden vectores y/l ácidos nucleicos exógenos se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volúmenes 1 -3 (3ª ed., Cold Spring Harbor Press, NY 2001).

Los métodos biológicos para la introducción de un polinucleótido de interés en una célula huésped incluye el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores víricos, especialmente los vectores retrovíricos, se han convertido en el método más ampliamente utilizado para la inserción de genes en células de mamífero, por ejemplo, células humanas. Otros vectores víricos pueden derivarse de lentivirus, poxvirus, virus del herpes simple I, adenovirus, virus adeno-asociados, y similares. Véase, por ejemplo, las Pat. de EE. UU. N.º 5.350.674 y 5.585.362.

Los medios químicos para la introducción de un polinucleótido de interés en una célula huésped incluyen los sistemas de dispersión coloidal, talco como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas, y sistemas basados en lípidos incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas, y liposomas. Un sistema coloidal ejemplar para su uso como un vehículo de suministro *in vitro* e *in vivo* es un liposoma (por ejemplo, una vesícula de membrana artificial).

En el caso en el que se utilice un sistema de suministro no vírico, un vehículo de suministro ejemplar es un liposoma. El uso de formulaciones lipídicas está contemplado para la introducción de ácidos nucleicos en una célula huésped (*in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*). En otro aspecto el ácido nucleico se puede asociar con un lípido. El ácido nucleico asociado con un lípido se puede encapsular en el interior acuoso de un liposoma, intercalarse en la bicapa lipídica de un liposoma, unirse a un liposoma mediante una molécula de unión que se asocia tanto con el liposoma como con el oligonucleótido, atraparse en un liposoma, formar un complejo con un liposoma, dispersarse en una solución que contiene un lípido, contenerse o formar un complejo con una micela o asociarse de otra manera con un lípido. Las composiciones asociadas de lípidos, lípido/ADN o lípido/vector de expresión no se limitan a ninguna estructura particular en solución. Por ejemplo, pueden estar presentes en una estructura bicapa, como micelas, o con una estructura "colapsada". También pueden estar simplemente intercalados en una solución, formando posiblemente agregados que no tienen un tamaño o forma uniforme. Los lípidos son sustancias grasas que pueden ser de origen natural o lípidos sintéticos. Por ejemplo, los lípidos incluyen las gotículas de grasa que existen naturalmente en el citoplasma, así como la clase de compuestos que contiene hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados, tales como los ácidos grasos, alcoholes, aminas, aminoalcoholes, y aldehídos.

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

Aplicación terapéutica

5 La presente invención se refiere a células definidas como anteriormente, para su uso en un tipo de terapia celular en la que las células T se modifican genéticamente para que expresen un receptor de conmutación y se infunden las células T modificadas a un receptor que las necesite. La célula infundida es capaz de destruir las células tumorales del receptor. A diferencia de las terapias con anticuerpos, las células T modificadas de la invención son capaces de replicarse *in vivo* dando como resultado una persistencia a largo plazo que puede dar lugar a un control del tumor sostenido.

10 La presente solicitud también desvela métodos para el tratamiento de un paciente de una enfermedad que comprende la administración al paciente de una cantidad eficaz de receptores de conmutación modificados de la presente invención.

15 Como se ha mencionado anteriormente, un aspecto de la invención se refiere a una célula T modificada genéticamente para que exprese una proteína de fusión para su uso en un método de tratamiento del cáncer, en el que dicha proteína de fusión comprende un primer dominio asociado con una señal negativa y un segundo dominio asociado con una señal positiva, en el que dicho primer dominio y segundo dominio se seleccionan respectivamente de entre el grupo que consiste en BTLA y CD28, BTLA y CD27, BTLA y ICOS, PD-1 y CD28, PD-1 y ICOS y PD-1 y CD27, y en el que dicha proteína de fusión es capaz de conmutar una señal negativa en una señal positiva para aumentar una respuesta inmunitaria. El cáncer puede ser, por ejemplo, un carcinoma ovárico, un carcinoma mamario, un carcinoma de colon, un glioblastoma multiforme, un carcinoma de próstata y leucemia.

25 Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o enfermedades linfoides malignas. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de riñón o renal, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma de células escamosas del pulmón, cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epitelial), cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo el cáncer gastrointestinal, gastrointestinal, tumores del estroma gastrointestinal (GIST), cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, glioblastoma, retinoblastoma, astrocitoma, tecomas, arrenoblastomas, hepatoma, enfermedades malignas hematológicas incluyendo linfoma no Hodgkin (NHL), mieloma múltiple y enfermedades malignas agudas, carcinoma endometrial o uterino, endometriosis, fibrosarcomas, coriocarcinoma, carcinoma de glándulas salivares, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinomas esofágicos, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, carcinoma nasofaríngeo, carcinomas laríngeos, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinomas de piel, Schwannoma, oligodendroglioma, neuroblastomas, rhabdomiomas, sarcoma osteogénico, leiomiomas, carcinomas del tracto urinario, carcinomas tiroideos, tumor de Wilm, así como linfoma de células B (incluyendo el linfoma no Hodgkin (NHL) de bajo grado/folicular; NHL linfocítico pequeño (SL); NHL de grado intermedio /folicular; NHL intermedio de grado difuso; NHL de alto grado inmunoblástico; NHL de alto grado linfoblástico; NHL de alto grado de células pequeñas no escindidas; enfermedad masiva; linfoma de células en mantel; linfoma relacionado con el SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenström); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfocítica aguda (ALL); leucemia de células pilosas, leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo post-trasplante (PLTD), así como proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales), y síndrome de Meigs. 'Tumor' como se utiliza en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, sea maligno o benigno, y a todos los tejidos y células precancerosas y cancerosas.

50 En el contexto de la presente invención, "antígeno tumoral" o "antígeno de trastorno hiperproliferativo" o "antígeno asociado con un trastorno proliferativo" se refiere a antígenos que son comunes a trastornos hiperproliferativos. En ciertos aspectos, los antígenos de trastornos hiperproliferativos de la presente invención se derivan de, cánceres incluyendo, pero sin limitación a melanoma metastático o primario, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemias, cáncer uterino, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer de riñón y adenocarcinomas tales como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer ovárico, cáncer pancreático, y similares.

55 En una realización, el antígeno tumoral de la presente invención comprende uno o más epítopos antigénicos de cáncer reconocidos inmunológicamente por los linfocitos infiltrantes del tumor (TIL) derivados de un tumor canceroso de un mamífero.

60 Los tumores malignos expresan varias proteínas que pueden servir como antígenos diana para un ataque inmunitario. Estas moléculas incluyen, pero no se limitan a antígenos específicos del tejido tales como MART-1, tirosinasa y GP100 en el melanoma y fosfatasa ácida prostática (PAP) y antígeno específico de próstata (PSA) en el cáncer de próstata. Otras moléculas diana pertenecen al grupo de moléculas relacionadas con la transformación tales como el oncogén HER-2/Neu/ErbB-2. Otro grupo más de antígenos diana son los antígenos onco-fetales tales como el antígeno carcinoembrionario (CEA). En el linfoma de células B la inmunoglobulina de idiotipo específico del tumor constituye un antígeno de inmunoglobulina verdaderamente específico del tumor que es único para el tumor

individual. Los antígenos de diferenciación de células B tales como CD19, CD20 y CD37 son otros candidatos a antígenos diana en el linfoma de célula B. Algunos de estos antígenos (CEA, HER-2, CD19, CD20, idiotipo) se han utilizado como dianas para la inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales con un éxito limitado.

- 5 En el contexto de las células T modificadas genéticamente como se expone anteriormente para su uso en un método de tratamiento del cáncer, los receptores de conmutación de la presente invención se pueden administrar opcionalmente a un paciente en combinación con otros agentes quimioterápicos. Los agentes quimioterápicos adecuados incluyen, por ejemplo, agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida; alquil sulfonato tal como busulfan, improsulfan, y piposulfan, aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa, y uredopa; etiliminas y metilmelaminas, que incluyen altretamina, trietilenemelamina, trietilenefosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, mecloretamina óxido hidrocloreuro, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tal como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomocina, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, caminomocina, carzinofilin, cromomicinas, dactinomocina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcellomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quclamina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tal como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tal como denopterina, metotrexato, pteroptera, trimetrexato; análogos de purina tal como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tal como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tal como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitiostano, testolactona; anti-adrenales tal como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; remplazador de ácido fólico tal como ácido folínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicouona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK.™; razoxane; sizofiran; spirogermanium; ácido tenuazónico; triazicouona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL™, Bristol-Miers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y docetaxel (TAXOTERE™, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptapurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etoposide (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); ácido retinoico; espiamicinas, capecitabina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

También se incluyen agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre los tumores tales como los anti-estrógenos que incluyen por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben la aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, icuprolida y goserelina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

También se incluyen agentes quimioterápicos que sean capaces de sensibilizar las células tumorales a TRAIL y superar la resistencia a TRAIL, tal como inhibidores del proteasoma e inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC), cicloheximida, mesilato de imatinib y otros inhibidores de proteína tirosina cianasa, 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina, trióxido de arsénico e inhibidores unidos a X de antagonistas de molécula pequeña de proteína de apoptosis; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de estos.

Se proporciona información adicional de los métodos del tratamiento del cáncer en la Pat. de EE. UU. N.º 7.285.522.

En consecuencia, en una realización preferida, una célula T modificada genéticamente como se ha expuesto anteriormente y que expresa los receptores de conmutación de la presente invención se puede utilizar para tratar el cáncer de mama. En otra realización preferida, se puede utilizar una célula T modificada genéticamente como se ha expuesto anteriormente y que expresa los receptores de conmutación de la invención para tratar el cáncer de colon. En otra realización se puede utilizar una célula T modificada genéticamente y que expresa los receptores de conmutación de la invención para tratar el cáncer de hígado. En otra realización preferida se puede utilizar una célula T modificada genéticamente y que expresa los receptores de conmutación de la invención para tratar el cáncer ovárico. En otra realización se puede utilizar una célula T modificada genéticamente y que expresa los receptores de conmutación de la invención para tratar la leucemia. En otra realización se puede utilizar una célula T modificada genéticamente y que expresa los receptores de conmutación de la invención para tratar el melanoma. En una divulgación se pueden utilizar los receptores de conmutación de la presente invención para tratar enfermedades aloinmunitarias, por ejemplo, el rechazo de injertos, o la enfermedad del injerto contra el huésped o del huésped contra el injerto.

Normalmente, para cada aplicación, se puede generar una pequeña "biblioteca" de receptores de conmutación candidatos y se evalúan comparativamente en modelos *ex vivo* e *in vivo* apropiados y bien establecidos para

determinar las eficacias relativas y las toxicidades.

La primera y segunda proteínas particulares utilizadas en los métodos variarán dependiendo de la enfermedad que se va a tratar. En general, para el cáncer, se desean receptores de conmutación que conviertan señales de transactivación inhibitoras en activadoras. Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, la respuesta inmunitaria antitumoral generada por la célula modificada de la invención puede ser parte de una estrategia de inmunoterapia adoptiva.

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

Los procedimientos *ex vivo* se conocen bien en la técnica y se exponen más completamente posteriormente. En resumen, las células se aíslan de un mamífero (preferentemente, un ser humano) y se modifican genéticamente (es decir, se transducen o transfectan *in vitro*) con un vector que expresa un receptor de conmutación de la invención. La célula modificada se puede administrar al mamífero receptor para proporcionar un beneficio terapéutico. El receptor mamario puede ser un ser humano y la célula modificada puede ser autóloga con respecto al receptor. De manera alternativa, las células pueden ser alogénicas, singénicas o xenogénicas con respecto al receptor.

El procedimiento para la expansión *ex vivo* de células madre hematopoyéticas y progenitoras que se describe en la Pat de EE. UU. N.º 5.199.942, se puede aplicar a las células de la presente invención. Se conocen otros métodos adecuados en la técnica, pero lo tanto, la presente invención no se limita a ningún método en particular para la expansión de las células *ex vivo*. En resumen, el cultivo y expansión *ex vivo* de células T comprende: (1) recolectar células madre hematopoyéticas CD34+ y progenitoras de un mamífero a partir de recolección de sangre o explantes de médula ósea; y (2) expandir dichas células *ex vivo*. Además de los factores de crecimiento celular descritos en la Pat de EE. UU. N.º 5.199.942 se pueden utilizar otros factores tales como flt3-L, IL-1, IL-3 y ligando c-kit, para el cultivo y la expansión de las células.

Además de la utilización de vacunas basadas en células en los términos de la inmunización *ex vivo*, la presente invención también proporciona composiciones y desvela métodos para la inmunización *in vivo* para desencadenar una respuesta inmunitaria dirigida contra un antígeno en un paciente.

En general, las células activadas y expandidas como se describe en el presente documento se pueden utilizar en el tratamiento y prevención de enfermedades que aparecen en individuos que están inmunocomprometidos. En particular, las células modificadas de la invención se utilizan en el tratamiento del cáncer. Por lo tanto, la presente invención proporciona células T genéticamente modificadas como se ha expuesto anteriormente para su uso en métodos para el tratamiento o prevención del cáncer que comprende la administración a un sujeto que necesita las mismas, de una cantidad terapéuticamente eficaz de las células T modificadas de la invención.

Las células T modificadas de la presente invención se pueden administrar solas, o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes tales como IL-2 u otras citocinas o poblaciones celulares. En resumen, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender una población celular diana como se ha descrito en el presente documento, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina tampón neutra, solución salina tampón de fosfato y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente invención se formulan preferentemente para la administración intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar de manera apropiada a la enfermedad que se va a tratar (o prevenir). La cantidad y frecuencia de la administración se determinará por factores tales como la afección del paciente, y el tipo y gravedad de la enfermedad del paciente, aunque se pueden determinar las dosificaciones apropiadas por ensayos clínicos.

Cuando se indica "una cantidad inmunológicamente eficaz", "una cantidad antitumoral eficaz", "una cantidad inhibitora del tumor eficaz", o una "cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones de la presente invención que se va a administrar se puede determinar por un médico con la consideración de las diferencias del individuo en edad, peso, tamaño tumoral, extensión de la infección o metástasis, y afección del paciente(sujeto). Se puede establecer en general que una composición farmacéutica que comprende las células T descritas en el presente documento que puede administrar a una dosificación de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, preferentemente 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores entre en estos intervalos. Las composiciones de células T también se pueden administrar múltiples veces a estas dosificaciones. Las células se pueden administrar utilizando técnicas de fusión que se conocen comúnmente en inmunoterapia (véase, por ejemplo, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988). La dosificación y régimen de tratamiento óptimos para un paciente en particular los puede determinar fácilmente un experto en la técnica de la medicina controlando los signos de enfermedad del paciente y ajustando el tratamiento en consecuencia.

En ciertas realizaciones, puede ser deseable administrar las células T activadas a un sujeto y entonces posteriormente volver a extraer sangre (o llevar a cabo una aféresis), activar las células T del mismo de acuerdo con la presente invención y reinfundir al paciente con estas células T activadas y expandidas. Este proceso se puede llevar a cabo múltiples veces cada pocas semanas. En ciertas realizaciones, las células T se pueden activar a partir de extracciones de sangre de 10 cc a 400 cc. En ciertas realizaciones las células T se activan a partir de extracciones de sangre de 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc, o 100 cc. Para no estar limitado por la teoría, el uso de este protocolo de extracción de sangre múltiple / reinfusión múltiple puede seleccionar ciertas poblaciones de células T.

La administración de las composiciones al sujeto se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente, incluyendo por inhalación de un aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implante o trasplante. Las composiciones descritas en el presente documento se pueden administrar a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, intraganglionar, intramedular, intramuscular, por inyección intravenosa (i.v.), o intraperitoneal. En una realización, las composiciones de células T de la presente invención se administran a un paciente por inyección intradérmica o subcutánea. En otra realización, las composiciones de células T de la presente invención se administran preferentemente por inyección i.v. Las composiciones de células T se pueden inyectar directamente en un tumor, ganglio linfático, o sitio de la infección.

En ciertas realizaciones de la presente invención, las células activadas y expandidas utilizando los métodos que se describen en el presente documento, u otros métodos conocidos en la técnica donde las células T se expanden en niveles terapéuticos, se administran a un paciente en conjunción con (por ejemplo, antes, simultáneamente o a continuación) cualquier número de modalidades de tratamientos relevantes, incluyendo pero sin limitarse al tratamiento con agentes tales como una terapia antivírica, cidofovir, e interleucina 2, citarabina (también conocida como ARA-C) o el tratamiento con natalizumab para pacientes de MS o el tratamiento con efalizumab para pacientes con psoriasis u otros tratamientos para pacientes con PML. En realizaciones adicionales, las células T de la invención se pueden utilizar en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato, y FK506, anticuerpo u otros agentes inmunoblivos tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias con anticuerpos, citoxin, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas y radiación. Estos fármacos inhiben la calcineurina fosfatasa dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la P7056 cinasa que es importante para la señalización inducida por factor de crecimiento (rapamicina). (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993; Isoniemi (*supra*)). En una realización adicional, las composiciones celulares de la presente invención se administran a un paciente en conjunción con (por ejemplo, antes, simultáneamente o a continuación) un trasplante de médula ósea, terapia ablativa con células T utilizando tanto agentes quimioterápicos tales como, fludarabina, radioterapia de rayo externo (XRT), ciclofosfamida, o anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. En otra realización, las composiciones celulares de la presente invención se administran a continuación de la terapia ablativa de células B tal como agentes de reacciones con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, en una realización, los sujetos pueden someterse a un tratamiento convencional con altas dosis de quimioterapia seguida por trasplante de células madre de sangre periférica. En ciertas realizaciones, a continuación del trasplante los sujetos reciben una infusión de células inmunitarias expandidas de la presente invención. En una realización adicional las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

La dosificación de los tratamientos anteriores que se va a administrar a los pacientes variará con la naturaleza precisa de la afección que se va a tratar y el receptor del tratamiento. El escalado de la dosificación para la administración a seres humanos se puede llevar a cabo de acuerdo con las prácticas aceptadas en la técnica. La dosis para el CAMPATH, por ejemplo, estará en el intervalo de 1 a aproximadamente 100 mg para un paciente adulto, habitualmente administrada diariamente durante un periodo de entre 1 y 30 días. La dosis diaria preferida es de 1 a 10 mg por día, aunque en algunos casos, se puede utilizar dosis mayores de hasta 40 mg por día (como se describe en la Patente de EE. UU. N.º 6.120.766).

Ejemplos experimentales

La invención se describe adicionalmente con detalle en referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan solamente con fines de ilustración, y no se consideran limitantes a menos de que se especifique otra cosa. Por lo tanto, la invención no se debería considerar de ninguna manera limitada por los siguientes ejemplos, sino más bien, se debería considerar que engloba todas y cada una de las variaciones que serán evidentes como resultado de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

Sin una descripción adicional, se cree que un experto habituado en la técnica puede, utilizando la descripción precedente y los siguientes ejemplos ilustrativos, producir y utilizar los compuestos de la presente invención y practicar los métodos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo, puntualizan específicamente las realizaciones preferidas de la presente invención, y no se consideran limitantes de ninguna manera del resto de la divulgación. **Ejemplo 1: Receptores de conmutación**

Los resultados presentados en el presente documento demuestran que se pueden modificar receptores quiméricos

para convertir señales negativas en señales positivas en células T. Los experimentos se diseñaron para desarrollar un método que evite la inhibición de un factor inhibidor tumoral sistémicamente y por lo tanto el sistema inmunitario completo. En resumen, se modificaron células T para que expresaran un receptor quimérico que codifica el dominio extracelular PD-1 (sin el dominio inhibidor PD-1) y un dominio de señalización estimulante CD28 o ICOS. La orientación del receptor quimérico colocado en el dominio extracelular PD-1 fuera de la célula y el dominio estimulante CD28 o ICOS dentro de la célula T. De esta manera la interacción de las células T con los antígenos tumorales en el microentorno tumoral está influenciada positivamente al unirse a los ligandos de PD-1 debido a que la señal en la célula la suministran el CD28 o ICOS señalizando más bien el endodominio que el endodominio PD-1 inhibidor nativo.

Los materiales y métodos empleados en estos experimentos se describen a continuación.

Materiales y métodos

Producción del receptor de conmutación

Las construcciones se diseñaron para el ensayo del receptor de conmutación de BTLA. A continuación, están las secuencias de cada construcción que se clonaron en el vector IVT basado en el pGEM.64A.

BTLA; SEQ ID NO: 1

**Atgaagacattgccctgccatgcttggaaactgggaaatattttgggtcttcttcttaatcccatactggacatctggaacatcc
atgggaaagaatcatgtgatgtacagctttatataaagagacaatctgaacactccatcttagcaggagatcccttgaactag
aatgccctgtgaaatactgtgctaacaggcctcatgtgacttgggtgcaagctcaatggaacaacatgtgtaaaacttgaagat
agacaacaagttggaaggaagagaagaacatttcatttctacatttgaaccngtcttcciaatgacaatgggcat
accgctgttctgcaaatttcagctaatctcattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaaaaagtgcctcaga
acgacccccaaggacgaaatggcaagcagaccctggctcctgtatagttacttcccttggggggattgccctactcatca
ctaacctgttctgcttctgctgctgagaaaggcaccgaaggaaagcaaatgaactctctgacacagcaggaagggaaa
ttaacctgggtgatgctcaccttaagagtgagcaaacagaaagcaccaggcaaaatcccaagctactgctatcagaaa
ctggaattatgataatgacctgaccttgttcaggatgcaggaagggtctgaagttattctaaccatgccctggaagaaaa
caaaccaggcattgittatgcttccctgaaccattctgicattggaccgaactcaagactggcaagaaatgtaaaagaagcac
caacagaatatgcatccatagtgtgaggagttaa**

BTLA-BTM-CD28; SEQ ID NO: 2

**Aagcttcccgaatgaagacattgccctgccatgcttggaaactgggaaatattttgggtcttcttcttaatcccatactggac
atctggaacatccatgggaaagaatcatgtgatgtacagctttatataaagagacaatctgaacactccatcttagcaggaga
tcccttgaactagaatgccctgtgaaatactgtgctaacaggcctcatgtgacttgggtgcaagctcaatggaacaacatgtgt
aaaacttgaagatagacaacaagttggaaggaagagaagaacatttcatttctacatttgaaccagtgtcttccaat
gacaatgggicalaccgctgttctgcaaatttcagctaatctcattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaa
aaagtgcctcagaacgacccccaaggacgaaatggcaagcagaccctggctcctgtatagttacttcccttggggggatt
gccttactactactactactctgcttctgctgctgctggaggaglaagaggagcaggctcctgacagtgactacatg
aacaigactccccgcccccggcccaccggcaagcattaccagccctatgccccaccacggcacttcgacgctatc
gctcctgataagcggccgca**

BTLA-BTM-CD27; SEQ ID NO: 3

Aagcttggcccatgaagacattgcctgccatgcttggaaactgggaaattatttgggtctcttcttaatcccatacttggaac
 atctggaacatccatgggaaagaatcatgtgatgtacagctttatataaagagacaatctgaacactccatcttagcaggaga
 tcctttgaaactagaatgccctgtgaatactgtgctaacaggcccatgtgacttgggtgcaagctcaatggaacaacatgtgt
 aaaacttgaagatagacaacaagtgggaaggaaagagaagaacatttcttctacatttgaaccagtgtcttctaat
 gacaatgggtcataccgctgttctgcaaatfttcagtctaaticattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaa
 aaagtgcctcagaacgacctccaaggacgaaatggcaagcagaccctggctcctgtatagttacttcttggggggatt
 gccctactacatcacltucctgttctgctgttctgctgctggaaaggaaatagatcaacaaggagaaagtctgtgga
 gcttgcagagccttgtctgttacagctgccccagggaggaggaggcagcaccatccccatccaggaggattaccgaaa
 ccggagcctgctgctccccctgataagcggccgca

BTLA-ITM-CD28; SEQ ID NO: 4

aagcttggcccatgaagacattgcctgccatgcttggaaactgggaaattatttgggtctcttcttaatcccatacttggaac
 atctggaacatccatgggaaagaatcatgtgatgtacagctttatataaagagacaatctgaacactccatcttagcaggaga
 tcctttgaaactagaatgccctgtgaatactgtgctaacaggcccatgtgacttgggtgcaagctcaatggaacaacatgtgt
 aaaacttgaagatagacaacaagtgggaaggaaagagaagaacatttcttctacatttgaaccagtgtcttctaat
 acaatgggtcataccgctgttctgcaaatfttcagtctaaticattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaaa
 agtgcctcagaacgacctccaaggacgaaatggcaagcagaccctggctcctgtatagttctggttaccataggatgt
 ggcaccttgggtgtgctgcaatfttgggatgcatacttattgaggagtaaggaggcagcctccgcaagtgactacatga
 acatgactccccggcggccccggccccaccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcclatcg
 ctctgataagcggccgca

5 BTLA-ITM-CD27; SEQ ID NO: 5

Aagcttggcccatgaagacattgcctgccatgcttggaaactgggaaattatttgggtctcttcttaatcccatacttggaac
 atctggaacatccatgggaaagaatcatgtgatgtacagctttatataaagagacaatctgaacactccatcttagcaggaga
 tcctttgaaactagaatgccctgtgaatactgtgctaacaggcccatgtgacttgggtgcaagctcaatggaacaacatgtgt
 aaaacttgaagatagacaacaagtgggaaggaaagagaagaacatttcttctacatttgaaccagtgtcttctaat
 gacaatgggtcataccgctgttctgcaaatfttcagtctaaticattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaa
 aaagtgcctcagaacgacctccaaggacgaaatggcaagcagaccctggctcctgtatagttctggttaccataggat
 gtgcagccttgggtgtgctgcaatfttgggatgcatacttattgaggaaatagatcaacaaggagaaagctctgtgg
 agcctgcagagccttgtctgttacagctgccccagggaggaggaggcagcaccatccccatccaggaggattaccgaaa
 accggagcctgctgctccccctgataagcggccgca

BTLA-BTM-ICOS; SEQ ID NO: 6

BTLA-ITM-ICOS-Z; SEQ ID NO: 9

**aagcttgccgcatgaagacattgcctgccatgcttggaaactgggaaatttttgggtcttctttaatcccatatctggacat
ctggaacatccatgggaaagaatcatgigatgtacagctttatataaagagacaalcigaacactccatcttagcaggagatc
cccttgaactagaatgccctgtgaaactgtgctaacaggcccatgtgacttgggcaagcicaatggaacaacatgtgla
aaacttgaagatagacaacaagttggaaggagaagaacatttcatttticaticacatttgaaccagtgttccctaatg
acaatgggicacaccgtgttctgcaaattttcagtciaaictcattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaaaa
agtgccctcagaacgacccccaaggagcgaatggcaagcagaccctggctcctgtatagttacttcttggggggattgc
cttactcactaccgttctgctgttctgctgctgtgttggcttacaaaaaagaagtatccatccagtgtgcacgacct
aacgggtaatacatgttcatgagagcagtgaaacacagcaaaaaatctagactcacagatgtgacctatgcagagtgaaag
ttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagcicaaictaggacgaaga
gaggagtacgatgtttggacaagagacgtggccgggaccctlgagatggggggaaagccgagaaggaagaacctca
ggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcggccg
ggggggcaagggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcag
gccctgccccctcgctaagcggccgca**

Transducción de células T

5 Los métodos de preparación de células T utilizando perlas de poliestireno paramagnéticas revestidas con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD38 se habían descrito (Laport et al., 2003, Blood 102:20042013). Se llevó a cabo una transducción lentivírica como se ha descrito (Levine et al., 2006, Proc Natl Acad Sci U S A 103:17372-17377). La electroporación de células T con ARN se había descrito (2010, Zhao et al., Cancer Res 70:9062) como un método para expresar estos receptores. El uso de vectores adenovíricos se había descrito (2004, Schroers et al., Exp Hematol 32:536). Varias de otras estrategias para expresar proteínas en células T se habían descrito (2009, June et al., Nat Rev Immunol 9:704).

Análisis de citocinas

15 Se llevó a cabo la cuantificación de factores citocina solubles utilizando una tecnología de matriz de perlas Luminex y los kits adquiridos en Life technologies (Invitrogen). Los ensayos se llevaron a cabo según el protocolo del fabricante con una curva de referencia de 8 puntos generada utilizando seres de dilución de 3 veces.

20 Los resultados de los experimentos se describen a continuación.

Los resultados presentados en el presente documento demuestran que se puede modificar y expresar un receptor quimérico en una célula T en la que el receptor quimérico convierte las señales negativas en señales positivas en la célula T. En consecuencia, la invención proporciona un tipo de terapia adoptiva con células T o células NK utilizando células que se han modificado genéticamente para que expresen los receptores de células T (TCR) o los receptores de antígeno quiméricos (CAR).

Se diseñaron experimentos para desarrollar un método de direccionamiento para evitar la inhibición de PD-1 sistemáticamente y, por lo tanto, el sistema inmunitario completo. El método de direccionamiento comprende la administración de células T que expresan receptores quiméricos que codifican, por ejemplo, el dominio extracelular PD-1, y más que el dominio PD-1 inhibitorio, un dominio de señalización estimulante CD28 o ICOS en la parte intracelular de la célula T. Por lo tanto, la interacción de las células T con los antígenos tumorales en el microentorno tumoral estaría influenciada positivamente al unirse los ligandos de PD-1, debido a que la señal en la célula es suministrada por el endodominio de señalización de CD28 o ICOS, más que el endodominio PD-1 nativo.

Conversión de las señales de BTLA

En una estrategia similar, se construyeron receptores quiméricos que codificaban BTLA. El BTLA junto con PD-1 también es un miembro de la familia de los CD28. El BTLA tiene varios ligandos, incluyendo HVEM, que se expresan en las células tumorales y otras células, a menudo en el microentorno tumoral. Se conoce bien que la interacción del BTLA con sus ligandos naturales en las células regula negativamente las respuestas inmunitarias de las células T

(Paulos et al., 2010, J Clin Invest 120:76-80; Derré et al., 2010. J Clin Invest 120:157-67; Chemnitz et al., 2006, J Immunol 176:6603-14). Para salvar esto se construyeron receptores quiméricos que comprendían el dominio extracelular de BTLA y los endodominios de señalización intracelular que incluían los dominios CD28 o ICOS.

5 En resumen, se utilizó una clonación molecular para construir los receptores quiméricos ejemplares representados en la Figura 1. Para ensayar si la unión del BTLA CCR expresado en la superficie de las células T podía expresarse apropiadamente y transducir señales mediante el dominio intracelular ICOS a CD3 zeta, los IVT del ARNm que codifica el BTLA CCR como se ha indicado, se electroporaron en células T estimuladas y se detectó la expresión de BTLA en la superficie mediante la proteína de fusión HVEM-Fc en diferentes momentos como se indica (Figura 1B).
 10 Las células T electroporadas se estimularon con línea celular negativa al ligando BTLA (KTPolCD86A2) o la línea celular positiva al HVEM ligando de BTLA (KTCD86Flu HVEM). Veinticuatro horas después de la estimulación se ensayó la IL-2 producida por las células T mediante un ELISA (Figura 1C). Los resultados demostraban que mediante la fusión del dominio extracelular BTLA con los dominios intracelulares de ICOS y CD3 zeta, las células T se podían activar mediante la línea celular que expresa en ligando HVEM de BTLA, indicando que la señal de BTLA
 15 podía convertirse a otras señales en forma de receptor quimérico co-estimulante (CCR).

El siguiente conjunto de experimentos se diseñó para evaluar si la señal inhibidora de BTLA podía convertirse en una señal coestimulante CD28 mediante el BTLA-CD28 CCR. Para encontrar la ventana adecuada que pudiera mostrar la señalización de CD38, se electroporaron diferentes dosis de ARN ($\mu\text{g}/0,1$ ml de células T) en células T y se detectó la expresión de los CAR (CD19z, CD19-28z) mediante FACS. El panel superior muestra los histogramas y el porcentaje de expresión del transgén y el panel inferior muestra la MFI de la expresión del transgén (Figura 2A). La producción de IL 2 de las células T electroporadas con ARN como se describe en la Figura 2A se estimuló mediante la línea celular positiva en CD19 K562-CD19 y la producción de IL-2 se ensayó mediante ELISA como se muestra en la Figura 2B. El panel superior muestra la producción de IFN-gamma y el panel inferior la de IL-2. Los
 20 resultados muestran que una dosis de ARN de 1,5 μg , a diferencia de las células T electroporadas con ARN CD19-28z, que presentaban por encima de 300 pg/ml de producción de IL-2, no tenía una producción de IL-2 detectable para las células T electroporadas con ARN CD19z. La producción de IFN-gamma podía detectarse a niveles similares para las células T electroporadas con CD19z y CD19-28z con la dosis de ARN de 1,5 μg . Por lo tanto, se utilizaron 1,5 μg de ARN como dosis de ARN para ensayar el polipéptido que convierte la señal BTLA-CD28.
 25

30 Las células T se co-electroporaron con 1,5 μg de CD19z y BTLA CCR como se indica y se estimularon con K562 que expresaban CD19 (K562CD19) o ambas CD19 y HVEM (IC562cd19/HVEM). Las líneas K562 que expresan mesotelina (con o sin HVEM) se utilizaron como controles (Figura 2C). Los resultados muestran que el BTLA de longitud completa (de tipo silvestre) suprimía la producción de IL-2 e INF-gamma. No había una producción de IL-2 detectable por las células T electroporadas solo con CD19z cuando se estimulaban con la línea celular positiva doble CD19/HVEM, mientras que las células T electroporadas con CD19-28z y estimuladas con la línea doble positiva CD19/HVEM producían más de 400 pg/ml de IL-2. Sin embargo, cuando las células T se co-electroporaron con ARN de CD19z y BTLA-CD28 CCR, la producción de IL-2 era 4 veces mayor que las células T electroporadas con CD19-28z cuando se estimulaban con la línea celular positiva doble CD19/HVEM. Las células T co-electroporadas con ARN de CD19z y CCR BTLA-CD28 producían más IFN-gamma que las células T electroporadas con CD19z o CD19-28z, cuando se estimulaban con la línea celular doble positiva CD19/HVEM, o K.562 positiva a CD19 que expresa niveles bajos de HVEM (Figura 2C). Los resultados que se presentan en el presente documento demuestran que las señales inhibidoras de BTLA podían convertirse en señales CD28 mediante el BTLA-CD28 CCR.
 35

45 El siguiente conjunto de experimentos se diseñó para ensayar si la señal inhibidora de BTLA se podía convertir en una señal coestimulante de ICOS mediante el BTLA-ICOS CCR. En resumen, la conversión de señal BTLA en ICOS se ensayó en un sistema de polarización de Th17 como se muestra en la Figura 3A. Las células T CD4 en reposo se co-electroporaron con CCR CD19z y BTLA como se indica (Tratamiento) y se estimularon con la línea celular positiva doble CD19/HVEM (Grupo 1 y 2, duplicados), o se electroporaron las células T con solo BTLA-ICOS y se estimularon con HVEM-Fc y OK.T3 unidos a la placa (grupo 3). Las perlas CD3/ICOS o perlas CD3/CD28 se utilizaron como controles positivo y negativo como se había descrito (2010, Paulos et al., Science Translational Medicine). Todos los cultivos se llevaron a cabo en presencia de un coctel de citocinas Th17. En días diferentes (como se indica) después de la estimulación, las células T se estimularon con PMA/Ionomicina e IL-17A y se detectó el IFN-gamma mediante tinción de citocinas intracelulares (Figura 3B). Los resultados mostraban que la señal ICOS convertida a partir de BTLA-ICOS aumentaba la producción celular de Th17 en presencia de señales inhibidoras de HVEM.
 50

Conversión de señales PD-1 en CD28

60 Para ensayar si la unión del PD1 CCR expresado en la superficie de las células T podía expresarse funcionalmente para transducir las señales mediante el dominio intracelular CD28 o CD27 o ICOS, se utilizaron ARN IVT que codifican PD1 CCR (se muestran las secuencias a continuación).
 65

PD1-I-ICOS; SEQ ID NO. 10

Atgcagatcccacagggccctggccagtcgtctggcggtgctacaactgggctggcggccaggatggttcttagact
 ccccagacagggccctggaacccccccaccttctccccagccctgctcgtggtgaccgaaggggacaacgccaccttcac
 ctgcagcttctccaacacatcggagagcttcgtgctaaactggtagccatgagccccagcaaccagacggacaagctgg
 ccgcttccccgaggaccgcagccagcccggccaggactgccgctccgtgtcacacaactgcccacggcgctgactt
 ccacatgagcgtggtaaggccccggcgcaatgacagcggcacctacctctgtggggccatctccctggcccccaaggc
 gcagatcaaagagagcctgcgggcagagctcaggggtgacagagagaaggcgagaagtgccacagcccaccaccagc
 cctcaccagggccagccggccagttccaaacctgggtgtctgggtaccataggatgtgcagcctttgtgtgctgcatt
 ttgggatgcatacttattgttggcttacaataaagaagtattcaaccagtgtgcacgaccccaacgggtgaatacatgttcatga
 gagcagtgaaacacagccaaaaatctagactcacagatgtgaccctataa

PD1-28-CD28; SEQ ID NO. 11

Atgcagatcccacagggccctggccagtcgtctggcggtgctacaactgggctggcggccaggatggttcttagact
 ccccagacagggccctggaacccccccaccttctccccagccctgctcgtggtgaccgaaggggacaacgccaccttcac
 ctgcagcttctccaacacatcggagagcttcgtgctaaactggtagccatgagccccagcaaccagacggacaagctgg
 ccgcttccccgaggaccgcagccagcccggccaggactgccgctccgtgtcacacaactgcccacggcgctgactt
 ccacatgagcgtggtaaggccccggcgcaatgacagcggcacctacctctgtggggccatctccctggcccccaaggc
 gcagatcaaagagagcctgcgggcagagctcaggggtgacagagagaaggcgagaagtgccacagcccaccaccagc
 cctcaccagggccagccggccagttccaaacctgggtgtttgggtgctgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggt
 gctttagtaacagtgcccttattttctgggtgaggagtaagaggagcaggtcctgcacagtgtactacatgaacatg
 actccccgcccggcccccccccccaagcattaccagccctatgccccaccacggcacttgcagcctatcgtcctta
 a

5 PD1-CD27; SEQ ID NO. 12

Atgcagatcccacagggccctggccagtcgtctggcggtgctacaactgggctggcggccaggatggttcttagact
 ccccagacagggccctggaacccccccaccttctccccagccctgctcgtggtgaccgaaggggacaacgccaccttcac
 ctgcagcttctccaacacatcggagagcttcgtgctaaactggtagccatgagccccagcaaccagacggacaagctgg
 ccgcttccccgaggaccgcagccagcccggccaggactgccgctccgtgtcacacaactgcccacggcgctgactt
 ccacatgagcgtggtaaggccccggcgcaatgacagcggcacctacctctgtggggccatctccctggcccccaaggc
 gcagatcaaagagagcctgcgggcagagctcaggggtgacagagagaaggcgagaagtgccacagcccaccaccagc
 cctcaccagggccagccggccagttccaaacctgggtgatccttgtgatcttcttggaaatgtccttgtttaccctggcc
 ggggcccctgttctcctcaacgaaggaaatatagatcaaacaaagggaagtcctgtggagcctgcagagccttgcgt
 tacagctgccccagggaggaggaggggcagcaccatccccatccaggaggattaccgaaaaccggagccttgcctctcc
 ccctaa

10 Se co-electroporaron el CCR PD1 y ARN CD19z en células T estimuladas y se detectaron los transgenes mediante Abs anti-PD1 y anti-CAR en los puntos temporales que se indican (Figura 4A). Las células T electroporadas como se describe en la Figura 4A se co-cultivaron con Nalm6 (línea de leucemia de células B humanas) que expresan PD-L1

o GFP como control, o K562-CD19 que expresan PD-L1 o ICOSL como control. Se ensayó la producción de IFN-gamma 24 horas después del co-cultivo. Las células T co-introducidas con CD19z y PD1-CD28 (PD1-28) mostraban una producción de IFN-gamma significativamente mayor que las células T electroporadas solo con CD19z, o co-electroporadas con PD1, con el dominio citoplasmático truncado, o PD1-CD27 (PD1-27). Cuando se cultivaban con líneas celulares positivas dobles CD19/PD-L1, se veía una fuerte inhibición de células T cuando las células T se co-electroporaban con CD19z y PD1 de longitud completa (de tipo silvestre) y se estimulaban con las líneas positivas doble CD19/PD-L1 (Figura 4B).

Las células T co-electroporadas como se describe en la Figura 4A se co-cultivaron con Nalm6 (línea celular de leucemia de células B humanas) que expresan PD-L1 o GFP como control, o K562-CD19 que expresan PD-L1 o ICOSL, como control. Se ensayó la producción de IL-2 24 horas después del co-cultivo. Las células T co-introducidas con CD19z y PD1-CD28 (PD1-28) presentaban una producción de IL-2 significativamente mayor que las células T electroporadas con solo CD19z, o co-electroporadas con PD1 con el dominio citoplasmático truncado, o PD1-CD27 (PD1-27). Cuando se co-cultivaban con líneas celulares positivas dobles CD19/PD-L1, se veía una fuerte inhibición de células T cuando las células T se co-electroporaban con CD19z y PD1 de longitud completa y se estimulaban con las líneas celulares positivas dobles CD19/PD-L1 (Figura 4C).

Las células T co-electroporadas como se describe en la Figura 4A se ensayaron en un ensayo CTI basado en flujo, las células T co-introducidas con CD19z y PD1 presentaban una capacidad de destrucción significativamente reducida contra la diana Nalm6-PD-L1, mientras que no se veían diferencias significativas para las células T co-electroporadas con CCR PD1 en comparación con las células T electroporadas con solo CD19z, cuando se utilizaban Nalm6-PD1 como diana. Cuando se utilizaban Nalm6 negativa al ligando de PD1, no había diferencias significativas para todos los grupos de células T, incluyendo las células T co-electroporadas con CD19z y PD1.

El siguiente conjunto de experimentos se diseñó para la inhibición inversa de PD1 mediante la co-introducción con CCR PD1-CD28. Para imitar el microentorno tumoral o bajo infección crónica en el que las células T son positivas a PD1, se estimularon las células T con pelias CD3/CD28 u OKT3/PBMC/IL2 y se co-electroporaron con CD19z (10 µg) y PD1 (5 µg) con un CCR PD1 adicional (10 µg) como se indica. Se detectó la expresión de CAR y PD1 y/o CCR PD1 mediante FACS un día después de la electroporación (Figura 5A).

Las células T electroporadas como se muestra en la Figura 5A se co-cultivaron con Nalm6 o K562-CD19 que expresaban PD-L1. Se ensayó la producción de IL-2 después de una noche de co-cultivo. Los resultados demostraban que había una disminución de la cantidad de IL-2 producida por las células T electroporadas con CD19z solo, en comparación con las mismas células T co-cultivadas con las líneas positivas a CD19 sin PD-L1. Sin embargo, en presencia de PD1 la producción de IL-2 se bloqueaba completamente cuando se co-cultivaban con líneas celulares positivas a PD-L1, excepto las células T co-electroporadas con PD1-CD28 (PD1-28), que presentaban una producción de IL-2 mucho mayor que las células T CD19z solas, mientras que la expresión de PD1 en las células T tenía una mínima influencia sobre las células T cuando las células T se co-cultivaban con líneas celulares negativas a PD-L1 (Figura 5B).

Las células T electroporadas como se muestra en la Figura 5A se co-cultivaron con Nalm6 o K562-CD19 que expresan PD-L1. Se ensayó la producción de IFN-gamma después de una noche de co-cultivo (Figura 5C). Se veía un perfil de producción de citocinas similar al de producción de IL-2 que se muestra en la Figura 5B. Los resultados presentados en el presente documento demuestran que el CCR PD1-CD28 puede invertir el efecto inhibitorio de PD1 y promueve las funciones efectoras de las células T.

Conversión de señales PD1 en ICOS

Se electroporaron las células T CD4 con PD1 (o las variantes de PD1) y ARNm de CAR CD19-Z (10 µg de cada). 4 horas después de la electroporación (día 0), se mezclaron las células T con células K562 (0,5:1 – K562:células T) que expresaban PD-L1 y CD19 en medio de cultivo R10 en presencia de IL-1 (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), IL-23 (20 ng/ml), y anticuerpos neutralizantes (10 µg/ml) contra IL-4 e IFNγ. En los días indicados (5, 9 y 12 días después de la electroporación) se incubaron las células durante 4 horas con PMA (3 µg/ml) y ionomicina (1 µg/ml) y GolgiStop para la tinción intracelular de citocinas. Se llevó a cabo una tinción de superficie para CD4, seguido por la tinción intracelular para IFN-gamma, IL-17 e IL-2. Las células T CD4 estimuladas con perlas anti-CD28CD3 y perlas anti-ICOS/CD3 se utilizaron como controles (Figura 6A). La producción de citocinas estaba aumentada, particularmente en el día 9 en las células que expresan PD1-ICOS en comparación con las de PD1 de tipo silvestre o PD1 sin cola. La proliferación celular de células T estimuladas se muestra en la Figura 6C.

Receptores quiméricos de PD-1

El PD-1 está regulado positivamente en la superficie de células T CD8 agotadas en pacientes con infección vírica crónica. El bloqueo de la señal PD-1:PD-L1 restaura la función de PD-1 que expresan las células T CD8 agotadas. Muchos tumores expresan PD-L1 proporcionando un microentorno inmunosupresor.

El propósito de los siguientes experimentos es dirigir las células T transferidas adoptivamente para superar el microentorno tumoral inhibitorio introduciendo receptores quiméricos PD-1 en el sitio del tumor.

Se observó que el efecto inhibitorio de PD1 de ts sobre la producción de citocinas se rescata por las construcciones quiméricas PD-1 (Figura 7). Sin embargo, los receptores quiméricos PD1 no afectan la producción de granzima B (Figura 8). De manera similar, se observaban mínimas diferencias en la actividad citolítica de las células T CD8 en presencia o ausencia de PD1 (Figura 9).

El siguiente conjunto de experimentos se diseñó para evaluar el efecto de receptores quiméricos PD-1 sobre la proliferación de células T (Figura 10). Se observó que el receptor quimérico PD1-CD28 aumenta el número de células T CD8 (Figura 11).

En resumen, los resultados presentados en el presente documento demuestran que las construcciones quiméricas PD-1 no presentan los efectos inhibitorios que muestra el PD-1 de ts. El PD1-CD28 parece que aumenta la producción de TNF α , IL-2 e IFN γ en las células T CD4. Los receptores quiméricos PD-1 no mostraba una citotoxicidad por encima de las células T que expresan el propio CD19CARz. El PD1-CD28 aumentaba el número de células T CD8 por encima de las células T que expresan en propio CD19CARz.

Redirección de la señalización co-inhibidora a co-estimulación positiva

Los resultados presentados en el presente documento demuestran que los receptores de conmutación se expresaban en las células T por electroporación o con vectores lentivíricos. Se observó que los CAR y receptores de conmutación se pueden expresar en la misma célula T. Cuando las células que expresan CAR o TCR y el receptor de conmutación se exponen a las células tumorales que tienen ligandos para BTLA o PD-1, las células T demuestran que tienen una respuesta inmunitaria positiva, más que la respuesta inhibitoria habitual.

Cuando estos receptores quiméricos se expresan en las células T, en el caso del receptor de conmutación BTLA, al interactuar con su ligando natural HVEM en las células tumorales, se observó que las células T se estimulaban y entonces expresaban funciones asociadas con efectos antitumorales positivos, incluyendo la secreción de IFN-gamma.

Otro importante resultado de estos estudios es que la interacción HVEM:BTLA con el receptor quimérico da lugar al aumento de secreción de IL-17. Este es un marcador de las células TH-17, una célula que se sabe que es útil para la inmunoterapia tumoral (Martin-Orozco et al., 2009, Immunity 31:787-98; Paulos et al., 2010, Science Translational Medicine 2:55-78; Garaude et al., 2010, Sci Transl Med 2(55):55ps2). Por ejemplo, los resultados presentados en el presente documento demuestran que las células T que expresan CAR y receptores de conmutación de BTLA con dominios de señalización ICOS se polarizaban para secretar grandes cantidades de IL-17.

Además, los resultados presentados en el presente documento muestran que las células T que expresan CAR y receptores de conmutación de PC1 con CD28, y los dominios eliminados se evitaba que tuvieran inhibición y en vez de eso destruyeran células tumorales y secretaran citocinas (IL-2 e IFN-gamma) si expresan los receptores de conmutación de PD-1.

Sin el deseo de quedar ligados por ninguna teoría en particular, se cree que al expresar los receptores antigénicos quiméricos (CAR) con receptores de conmutación de PD-1 o BTLA en las células T que se introducen entonces en el microentorno tumoral, las células T tienen un aumento del efecto antitumoral y presentan un fenotipo TH17. El tipo de transferencia de células T adoptiva para la inmunoterapia tumoral de la invención también es aplicable en el área de la terapia vacunal, tal como para infecciones víricas crónicas incluyendo el VIH y otros virus tales como el EBV, HCV o CMV. Esta tecnología se podría incorporar fácilmente en otros ensayos que se están utilizando actualmente de células T modificadas genéticamente también con TCR. Por ejemplo, los receptores de conmutación de la invención se pueden utilizar en el contexto de células T con TCR específicos de antígenos del cáncer tal como MAGE-A3 y NY-ESO-1, y se cree que la inclusión de receptores de conmutación con estas células T aumentaría la potencia de las células T.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA
June, Carl H
Zhao, Yangbing

<120> RECEPTORES DE CONMUTACIÓN COESTIMULANTE

<130> 046483-6010-00-WO.601501

<150> US 61/513.259

<151> 29-07-2011

ES 2 723 181 T3

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
 <211> 870
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

<400> 1

atgaagacat	tgccctgccat	gcttggaact	gggaaattat	tttgggtcct	cttcttaatc	60
ccatatctgg	acatctggaa	catccatggg	aaagaatcat	gtgatgtaca	gctttatata	120
aagagacaat	ctgaacactc	catcttagca	ggagatccct	ttgaactaga	atgccctgtg	180
aaatactgtg	ctaacaggcc	tcatgtgact	tggtgcaagc	tcaatggaac	aacatgtgta	240
aaacttgaag	atagacaaac	aagttggaag	gaagagaaga	acatttcatt	tttcattcta	300
cattttgaac	cagtgcttcc	taatgacaat	gggtcatacc	gctgttctgc	aaattttcag	360
tctaactctca	ttgaaagcca	ctcaacaact	ctttatgtga	cagatgtaa	aagtgcctca	420
gaacgaccct	ccaaggacga	aatggcaagc	agaccctggc	tccgttatag	tttacttctc	480
ttggggggat	tgccctctact	catcactacc	tgtttctgcc	tgttctgctg	cctgagaagg	540
caccaaggaa	agcaaaatga	actctctgac	acagcaggaa	gggaaattaa	cctggttgat	600
gctcacctta	agagtggagca	aacagaagca	agcaccaggc	aaaattccca	agtactgcta	660
tcagaaactg	gaatttatga	taatgaccct	gacctttggt	tcaggatgca	ggaagggctc	720
gaagtttatt	ctaatccatg	cctggaagaa	aacaaaccag	gcattgttta	tgcttccctg	780
aaccattctg	tcattggacc	gaactcaaga	ctggcaagaa	atgtaaaaga	agcaccaaca	840
gaatatgcat	ccatatgtgt	gaggagttaa				870

15
 <210> 2
 <211> 685
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

25 <400> 2

ES 2 723 181 T3

aagcttgccg ccatgaagac attgcctgcc atgcttggaa ctgggaaatt attttgggtc 60
 ttctttcttaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaaagaatc atgtgatgta 120
 cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta 180
 gaatgccttg tgaataactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga 240
 acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca 300
 tttttcattc tacatcttga accagtgtct cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct 360
 gcaaattttc agtctaactc cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta 420
 aaaagtgcct cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gctcctgtat 480
 agtttacttc ctttgggggg attgcctcta ctcatcacta cctgtttctg cctgttctgc 540
 tgcttgagg agtaagagga gcaggctcct gcacagtga tacatgaaca tgactcccg 600
 ccgccccggg cccaccgca agcattacca gccctatgcc ccaccacgg acttccgagc 660
 ctatcctcc tgataagcgg ccgca 685

5 <210> 3
 <211> 701
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 3

aagcttgccg ccatgaagac attgcctgcc atgcttggaa ctgggaaatt attttgggtc 60
 ttctttcttaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaaagaatc atgtgatgta 120
 cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta 180
 gaatgccttg tgaataactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga 240
 acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca 300
 tttttcattc tacatcttga accagtgtct cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct 360
 gcaaattttc agtctaactc cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta 420
 aaaagtgcct cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gctcctgtat 480
 agtttacttc ctttgggggg attgcctcta ctcatcacta cctgtttctg cctgttctgc 540
 tgcttggaag gaaatataga tcaaacaaag gagaagtcc tgtggagcct gcagagcctt 600
 gtcgttacag ctgccccagg gaggaggagg gcagcaccat ccccatccag gaggattacc 660
 gaaaaccgga gctgctgc tccccctgat aagcgccgc a 701

15 <210> 4
 <211> 685
 <212> ADN
 <213> Artificial

20

<220>

<223> Sintetizado químicamente

<400> 4

5

```

aagcttgccg ccatgaagac attgacctgcc atgcttggaa ctgggaaatt attttgggtc      60
ttcttcttaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaaagaatc atgtgatgta      120
cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta      180
gaatgccctg tgaataactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga      240
acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca      300
tttttcattc tacattttga accagtgcct cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct      360
gcaaattttc agtctaactc cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta      420
aaaagtgcct cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gctcctgtat      480
agtttctggt taccatagg atgtgcagcc tttggtgtag tctgcatttt gggatgcata      540
cttattgagg agtaagagga gcaggctcct gcacagtgcac tacatgaaca tgactccccg      600
ccgccccggg cccaccgcga agcattacca gccctatgcc ccaccacgcg acttcgcagc      660
ctatcgctcc tgataagcgg ccgca                                             685

```

<210> 5

<211> 701

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Sintetizado químicamente

<400> 5

15

```

aagcttgccg ccatgaagac attgacctgcc atgcttggaa ctgggaaatt attttgggtc      60
ttcttcttaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaaagaatc atgtgatgta      120
cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta      180
gaatgccctg tgaataactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga      240
acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca      300
tttttcattc tacattttga accagtgcct cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct      360
gcaaattttc agtctaactc cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta      420
aaaagtgcct cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gctcctgtat      480
agtttctggt taccatagg atgtgcagcc tttggtgtag tctgcatttt gggatgcata      540
cttattgaag gaaatataga tcaaacaag gagaaagtcc tgtggagcct gcagagcctt      600
gtcgttacag ctgccccagg gaggaggagg gcagcaccat ccccatccag gaggattacc      660
gaaaaccgga gcctgcctgc tccccctgat aagcggccgc a                                             701

```

20

ES 2 723 181 T3

<210> 6
 <211> 672
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 10
 <400> 6

```

aagcttgccg ccatgaagac attgcctgcc atgcttggaa ctgggaaatt attttgggtc      60
ttcttcttaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaagaatc atgtgatgta      120
cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta      180
gaatgccttg tgaataactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga      240
acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca      300
tttttcattc tacattttga accagtgtt cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct      360
gcaaattttc agtctaactc cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta      420
aaaagtgcct cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gctcctgtat      480
agtttacttc ctttgggggg attgcctcta ctcatcacta cctgtttctg cctgtttctgc      540
tgctgtgttt ggcttacaaa aaagaagtat tcatccagtg tgcaogaccc taacggtgaa      600
tacatgttca tgagagcagt gaacacagcc aaaaaatcta gactcacaga tgtgacccta      660
taagcggccg ca                                                                672
  
```

<210> 7
 <211> 1011
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 20
 <400> 7

```

aagcttgccg ccatgaagac attgcctgcc atgcttggaa ctgggaaatt attttgggtc      60
ttcttcttaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaagaatc atgtgatgta      120
cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta      180
gaatgccttg tgaataactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga      240
  
```

ES 2 723 181 T3

acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca 300
 tttttcattc tacattttga accagtgtt cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct 360
 gcaaattttc agtctaactc cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta 420
 aaaagtgcct cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gctcctgtat 480
 agtttacttc ctttgggggg attgcctcta ctcatcacta cctgtttctg cctgttctgc 540
 tgcctgtgtt ggcttacaaa aaagaagtat tcatccagtg tgcacgaccc taacggtgaa 600
 tacatgttca tgagagcagt gaacacagcc aaaaaatcta gactcacaga tgtgacccta 660
 tgcagagtga agttcagcag gagcgcagac gccccgcgt accagcaggg ccagaaccag 720
 ctctataacg agctcaatct aggacgaaga gaggagtacg atgttttggg caagagacgt 780
 ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg agaaggaaga accctcagga aggcctgtac 840
 aatgaactgc agaaagataa gatggcggag gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag 900
 cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac 960
 acctacgacg cccttcacat gcaggccctg cccctctgct aagcggccgc a 1011

5 <210> 8
 <211> 672
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 8

aagcttgccg ccatgaagac attgcctgcc atgcttggaa ctgggaaatt attttgggtc 60
 ttcttcttaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaaagaatc atgtgatgta 120
 cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta 180
 gaatgccttg tgaataactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga 240
 acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca 300
 tttttcattc tacattttga accagtgtt cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct 360
 gcaaattttc agtctaactc cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta 420
 aaaagtgcct cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gctcctgtat 480
 agtttctggg taccatagg atgtgcagcc tttgtttag tctgcatttt gggatgcata 540
 cttatttgtt ggcttacaaa aaagaagtat tcatccagtg tgcacgaccc taacggtgaa 600
 tacatgttca tgagagcagt gaacacagcc aaaaaatcta gactcacaga tgtgacccta 660
 taagcggccg ca 672

15 <210> 9
 <211> 1011

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

5 <400> 9

```

aagcttgccg ccatgaagac attgcctgcc atgcttgaa ctgggaaatt attttgggtc      60
ttctttettaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaaagaatc atgtgatgta      120
cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta      180
gaatgccctg tgaaatactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga      240
acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca      300
tttttcattc tacattttga accagtgtct cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct      360
gcaaattttc agtctaactc cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta      420
aaaagtgcct cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gctcctgtat      480
agtttacttc ctttgggggg attgcctcta ctcatcacta cctgtttctg cctgttctgc      540
tgctgtgttt ggcttaca aaagaagtat tcatccagtg tgcaacgacc taacggtgaa      600
tacatgttca tgagagcagt gaacacagcc aaaaaatcta gactcacaga tgtgacccta      660
tgcaagatga agttcagcag gagcgcagac gccccgcgct accagcaggg ccagaaccag      720
ctctataacg agctcaatct aggaacgaaga gaggagtacg atgttttggg caagagacgt      780
ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg agaaggaaga accctcagga aggcctgtac      840
aatgaactgc agaaagataa gatggcggag gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag      900
cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt taccaggtc tcagtacagc caccaaggac      960
acctacgacg cccttcacat gcagggcctg ccccctcgct aagcggccgc a          1011
    
```

10 <210> 10
 <211> 690
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

<400> 10

```

atgcagatcc cacaggcgcc ctggccagtgc gtctggggcg tgctacaact gggctggcgg      60
ccaggatggt tcttagactc cccagacagg ccctggaacc cccccacctt ctccccagcc      120
ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg      180
gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc      240
    
```

20

ES 2 723 181 T3

gccttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg 300
 cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc 360
 tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcccggca 420
 gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgccacag cccaccccag cccctcacc 480
 aggccagccg gccagttcca aaccctgggtg ttctgggttac ccataggatg tgcagcett 540
 gttgtagtct gcattttggg atgcatactt atttgttggc ttacaaaaa gaagtattca 600
 tccagtgtgc acgaccctaa cggatgaatac atgttcatga gagcagtga cacagccaaa 660
 aatctagac tcacagatgt gaccctataa 690

5 <210> 11
 <211> 717
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 11

atgcagatcc cacagggccc ctggccagtc gtctggggcg tgctacaact gggctggcgg 60
 ccaggatggt tcttagactc cccagacagc ccctggaacc cccccacct ctccccagcc 120
 ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 180
 gagagcttcg tgctaaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 240
 gccttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg 300
 cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc 360
 tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcccggca 420
 gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgccacag cccaccccag cccctcacc 480
 aggccagccg gccagttcca aaccctgggtg ttttgggtgc tgggtgggtg tgggtggagtc 540
 ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg gcctttatta ttttctgggt gaggagtaag 600
 aggagcaggc tctgacacag tgactacatg aacatgactc cccgccccc cgggcccacc 660
 cgcaagcatt accagcccta tgccccacca cgcgacttcg cagcctatcg ctctaa 717

15 <210> 12
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 12

atgcagatcc cacagggccc ctggccagtc gtctggggcg tgctacaact gggctggcgg 60

25

ES 2 723 181 T3

ccaggatggt	tcttagactc	cccagacagg	ccttggaaacc	ccccacctt	ctccccagcc	120
ctgctcgtgg	tgaccgaagg	ggacaacgcc	accttcacct	gcagcttctc	caacacatcg	180
gagagcttcg	tgctaaactg	gtaccgcatg	agccccagca	accagacgga	caagctggcc	240
gccttccccg	aggaccgcag	ccagcccggc	caggactgcc	gcttccgtgt	cacacaactg	300
cccaacgggc	gtgacttcca	catgagcgtg	gtcagggccc	ggcgcaatga	cagcggcacc	360
tacctctgtg	gggcatctc	cctggccccc	aaggcgcaga	tcaaagagag	cctgcgggca	420
gagctcaggg	tgacagagag	aagggcagaa	gtgcccacag	cccaccccag	cccctcacc	480
aggccagccg	gccagttcca	aaccctggtg	atccttgtga	tcttctctgg	aatgttcctt	540
gtttcaccc	tggccggggc	cctgttctc	catcaacgaa	ggaaatatag	atcaacaaa	600
ggagaaagtc	ctgtggagcc	tgacagacct	tgctcgttaca	gctgccccag	ggaggaggag	660
ggcagcacca	tccccatcca	ggaggattac	cgaaaaccgg	agcctgcctg	ctccccctaa	720

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular que comprende un primer dominio asociado con una señal negativa y un dominio intracelular que comprende un segundo dominio asociado con una señal positiva, donde dicho primer dominio y segundo dominio se seleccionan respectivamente de entre el grupo que consiste en BTLA y CD28, BTLA y CD27, BTLA e ICOS, PD-1 y CD28, PD-1 e ICOS y PD-1 y CD27, y donde dicha proteína de fusión es capaz de conmutar una señal negativa en una señal positiva para el aumento de una respuesta inmunitaria.
2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un dominio transmembrana.
3. La proteína de fusión de la reivindicación 2, donde dicho dominio transmembrana es el dominio transmembrana del polipéptido que se asocia con una señal negativa o el dominio transmembrana del polipéptido que se asocia con una señal positiva.
4. Una célula modificada para que exprese la proteína de fusión de la reivindicación 1.
5. La célula de la reivindicación 4 que comprende adicionalmente un receptor antigénico quimérico (chimeric antigen receptor, CAR), donde dicho CAR comprende un dominio de reconocimiento antigénico de un anticuerpo específico y un dominio intracelular de la cadena CD3-zeta.
6. La célula de la reivindicación 5, donde dicho dominio de reconocimiento antigénico se une específicamente al CD19.
7. Una célula modificada para que exprese:
- 1) una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular que comprende un primer dominio asociado con una señal negativa y un dominio intracelular que comprende un segundo dominio asociado con una señal positiva, donde dicho primer dominio y segundo dominio se seleccionan respectivamente de entre el grupo que consiste en BTLA y CD28, BTLA y CD27, BTLA e ICOS, PD-1 y CD28, PD-1 e ICOS y PD-1 y CD27, y donde dicha proteína de fusión es capaz de conmutar una señal negativa en una señal positiva para el aumento de una respuesta inmunitaria, y
 - 2) un receptor antigénico quimérico (CAR), donde dicho CAR comprende un dominio de reconocimiento antigénico de un anticuerpo específico y un dominio intracelular de una cadena CD3-zeta.
8. La célula de la reivindicación 7, donde dicho dominio de reconocimiento antigénico se une específicamente al CD19.
9. La célula de la reivindicación 7, donde dicho primer dominio y segundo dominio se seleccionan de entre el grupo que consiste en BTLA y CD28; PD-1 y CD28; PD-1 e ICOS; y PD-1 y CD27.
10. Un vector que comprende un ácido nucleico que codifica dicha proteína de fusión de la reivindicación 1.
11. Una célula T modificada genéticamente para que exprese una proteína de fusión para su uso en un método de tratamiento del cáncer, donde dicha proteína de fusión comprende un primer dominio asociado con una señal negativa y un segundo dominio asociado con una señal positiva, donde dicho primer dominio y segundo dominio se seleccionan respectivamente de entre el grupo que consiste en BTLA y CD28, BTLA y CD27, BTLA e ICOS, PD-1 y CD28, PD-1 e ICOS y PD-1 y CD27, y donde dicha proteína de fusión es capaz de conmutar una señal negativa en una señal positiva para el aumento de una respuesta inmunitaria.
12. La célula T para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, donde dicha célula T adicionalmente se modifica genéticamente para que exprese un receptor antigénico quimérico (CAR), donde dicho CAR comprende un dominio de reconocimiento antigénico de un anticuerpo específico y un dominio intracelular de la cadena CD3-zeta.
13. La célula T para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde dicha célula T es una célula T autóloga.

Fig. 1. Receptores quiméricos

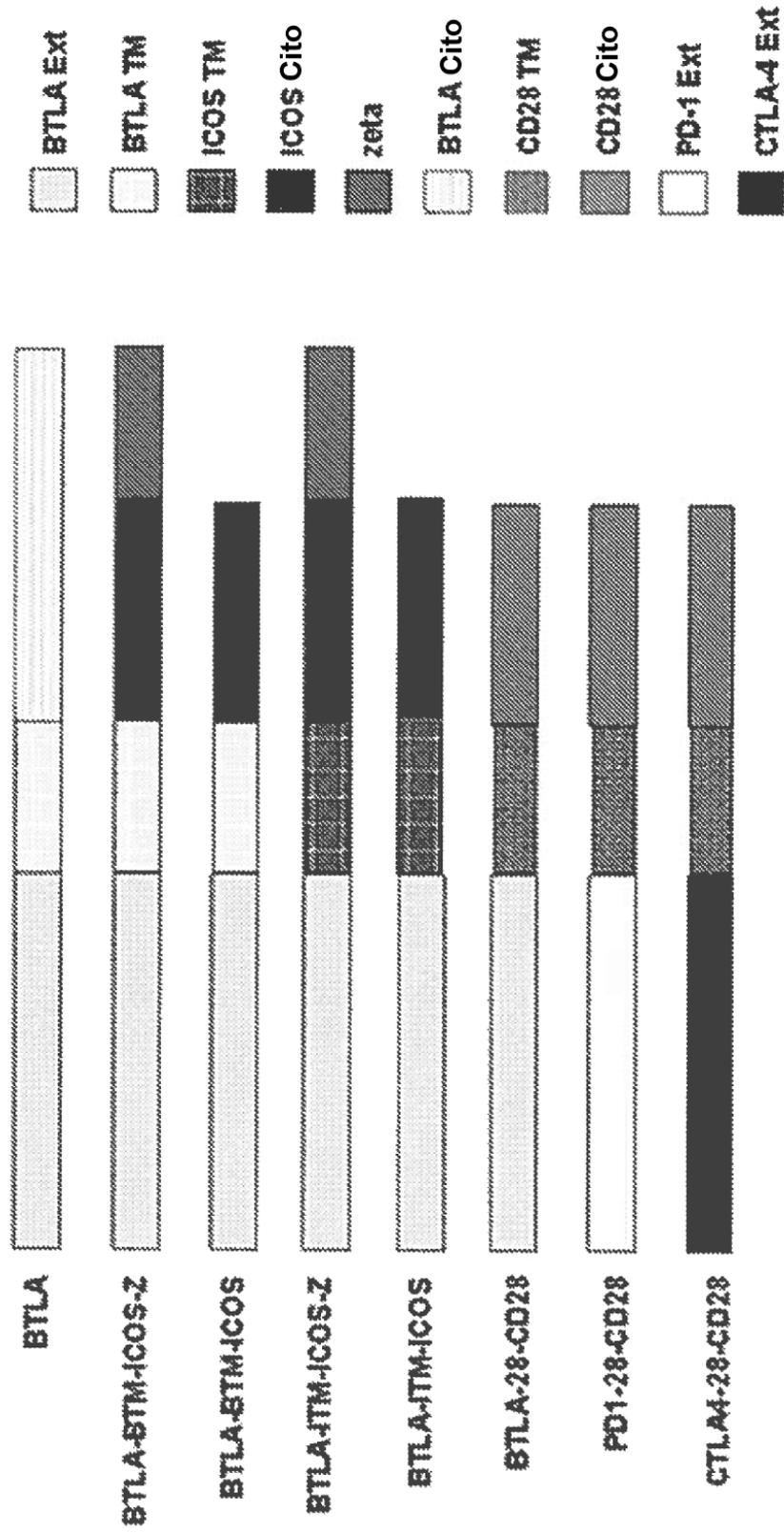


Figura 1A

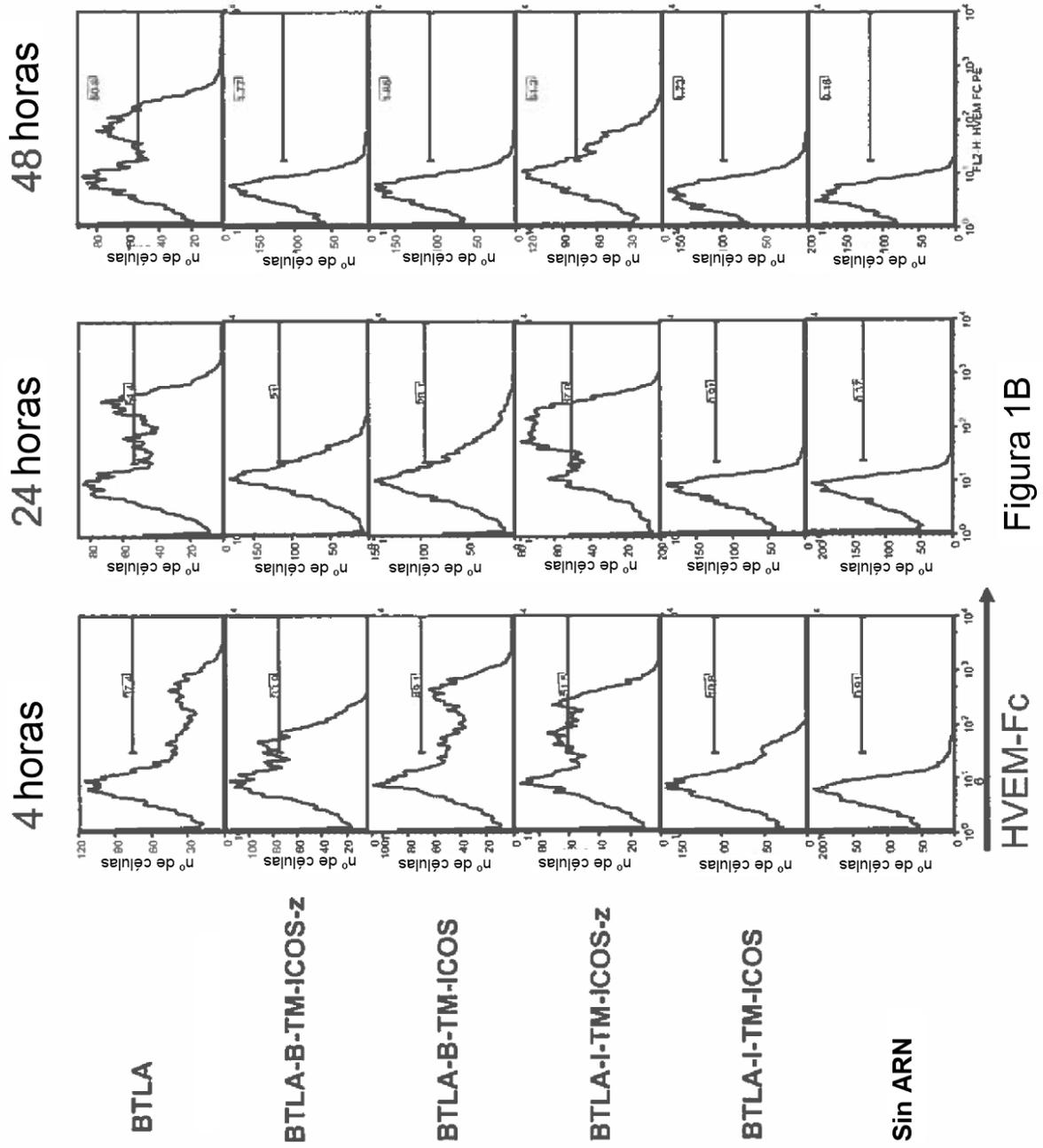


Figura 1B

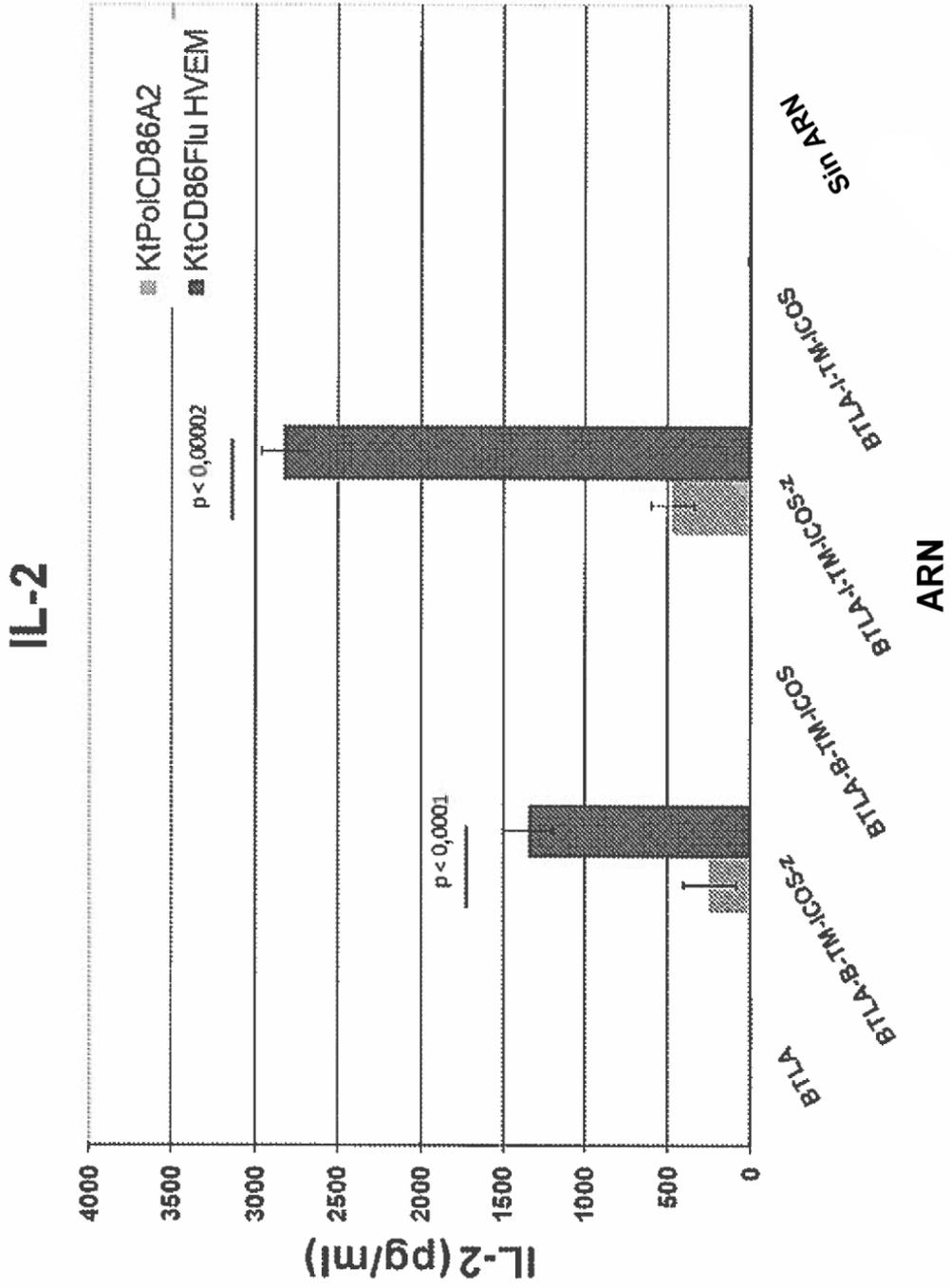


Figura 1C

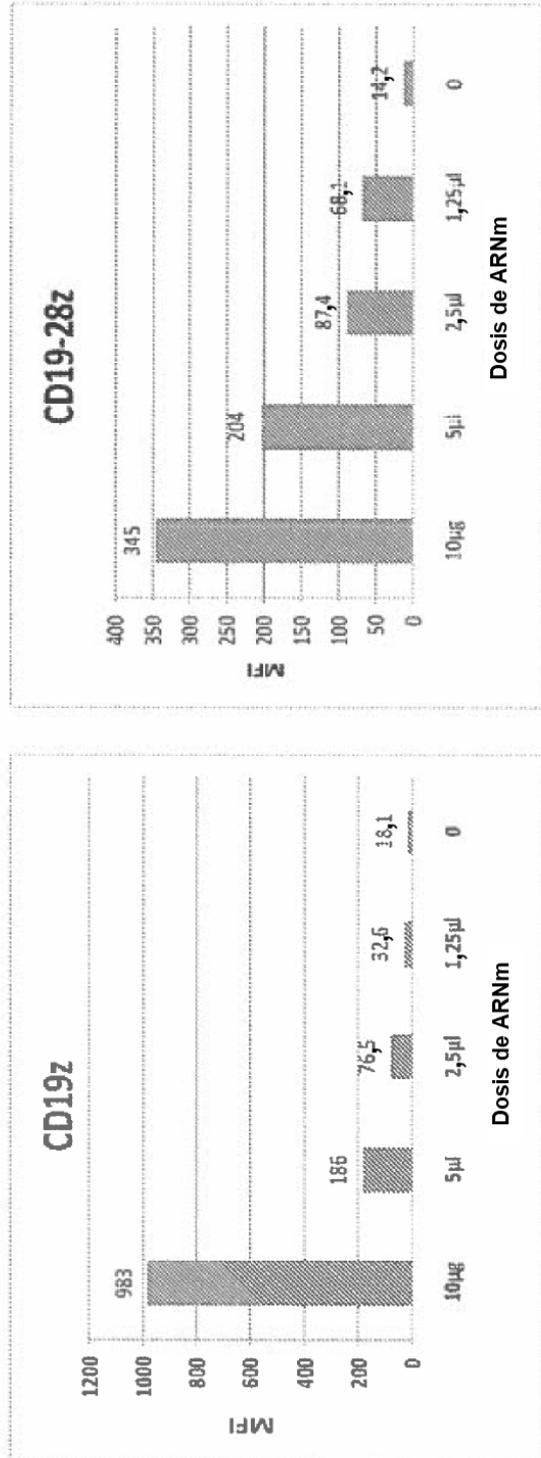
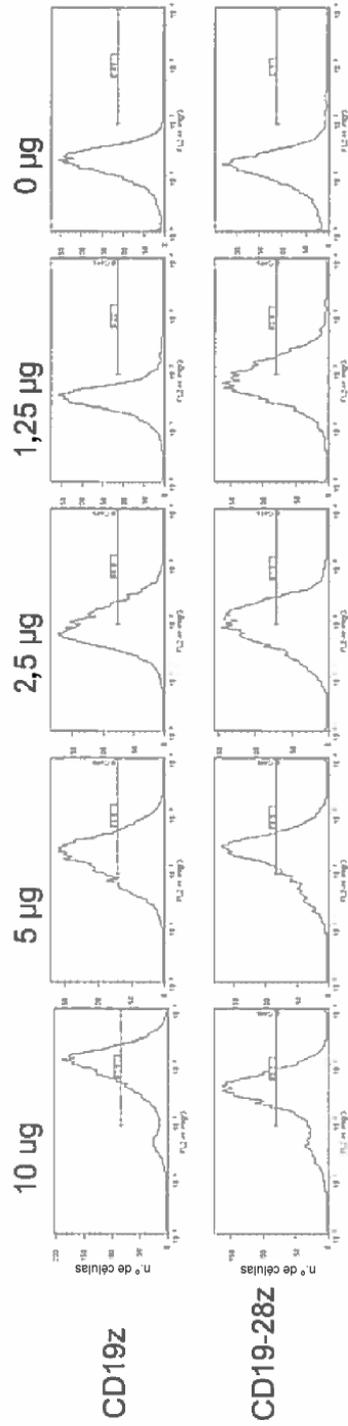


Figura 2A

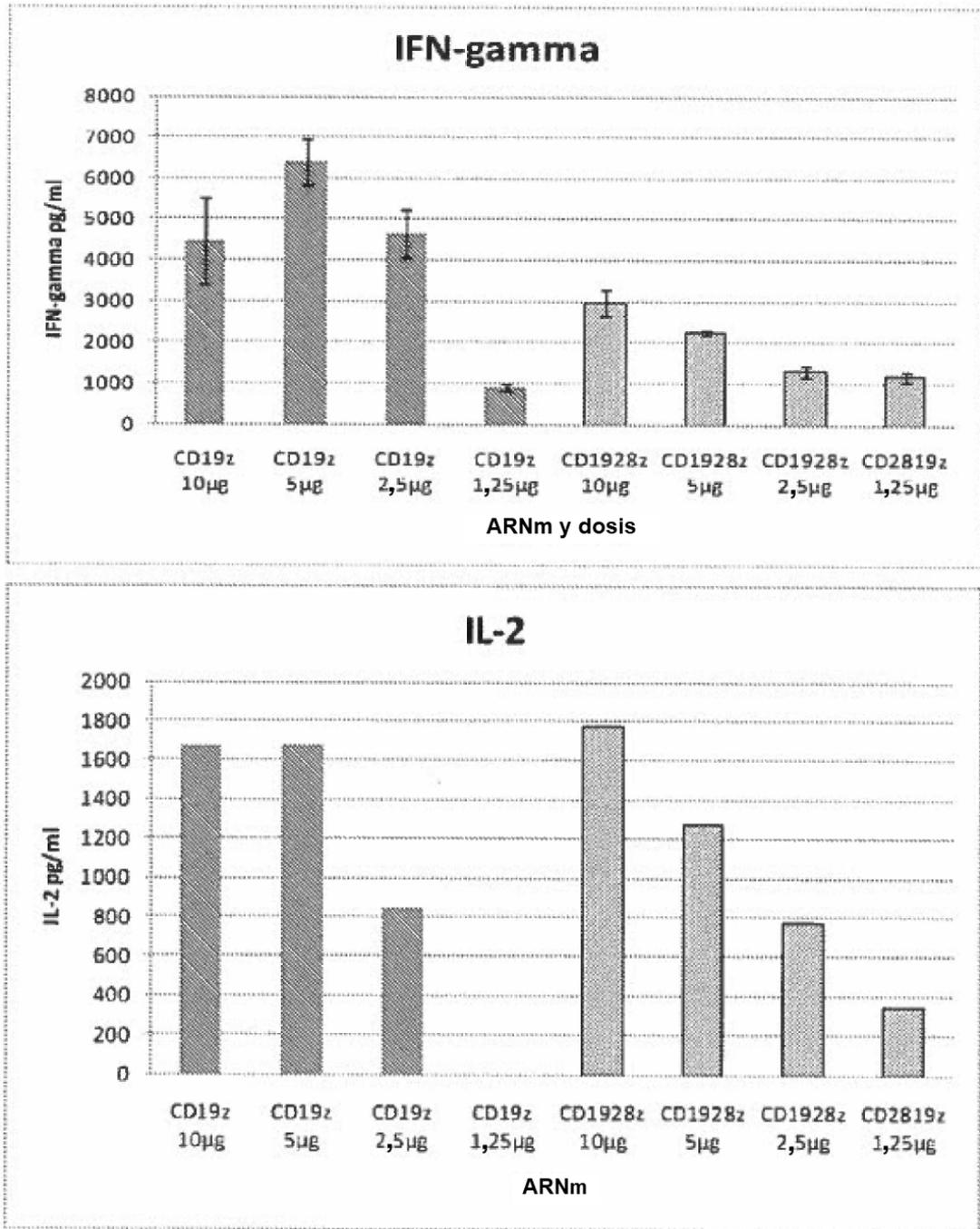


Figura 2B

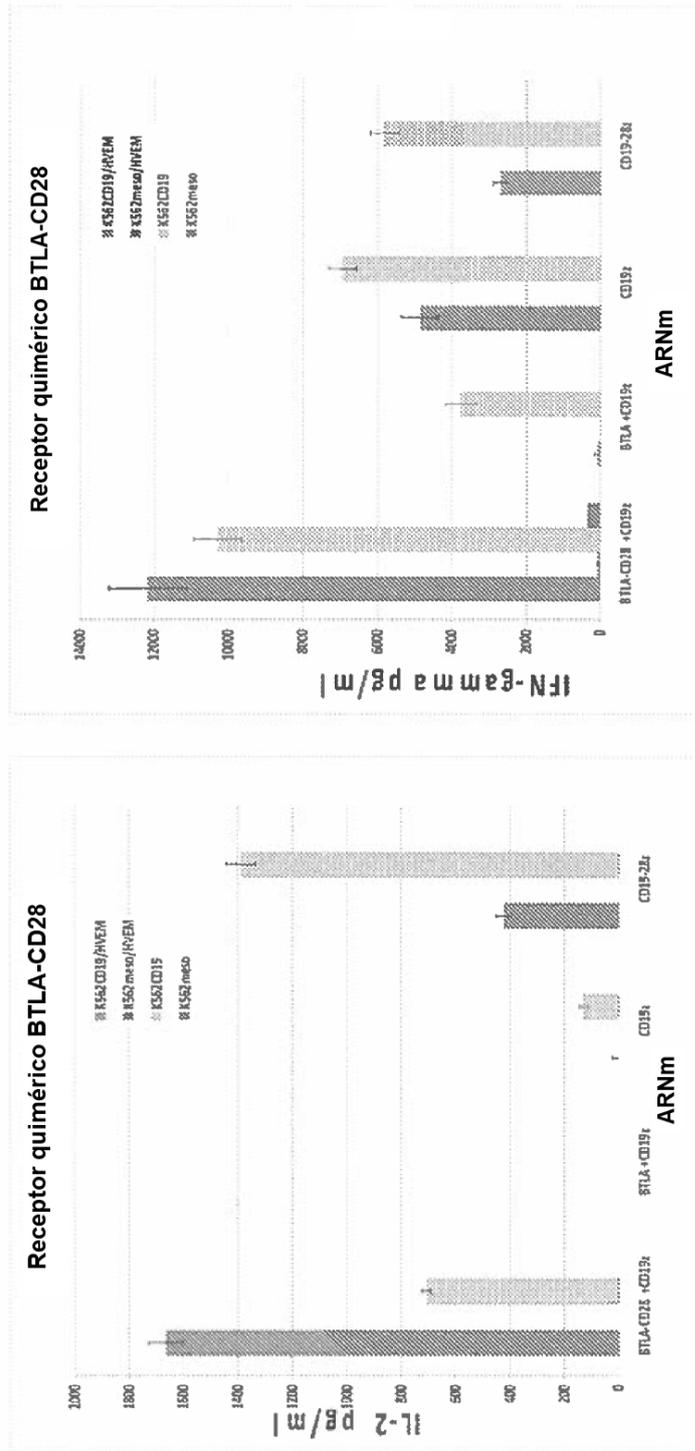


Figura 2C

Grupo	Tratamiento	Co-cultivo	Citocinas
1	BTLA-BTM-ICOS+CD19z	K562CD19-HVEM	Cóctel de citocinas Th17
2	BTLA-BTM-ICOS+CD19z	K562CD19-HVEM	Cóctel de citocinas Th17
3	BTLA-BTM-ICOS	HVEM-Fc/OKT3	Cóctel de citocinas Th17
4	BTLA- BTM-CD28 +CD19z	K562CD19-HVEM	Cóctel de citocinas Th17
5	CD3/ICOS perlas	No	Cóctel de citocinas Th17
6	CD3/CD28 perlas	No	Cóctel de citocinas Th17

Donante ND 365; Células CD4⁺ recientes

Cóctel de citocinas Th17

- IL-1 β 10ng/ml
- IL-6 10ng/ml
- IL-23 20ng/ml
- Anti-IL-4 10 μ g/ml
- Anti-IFN γ 10 μ l/ml
- IL-2 50u/ml (comienzo el día 5)

Figura 3A

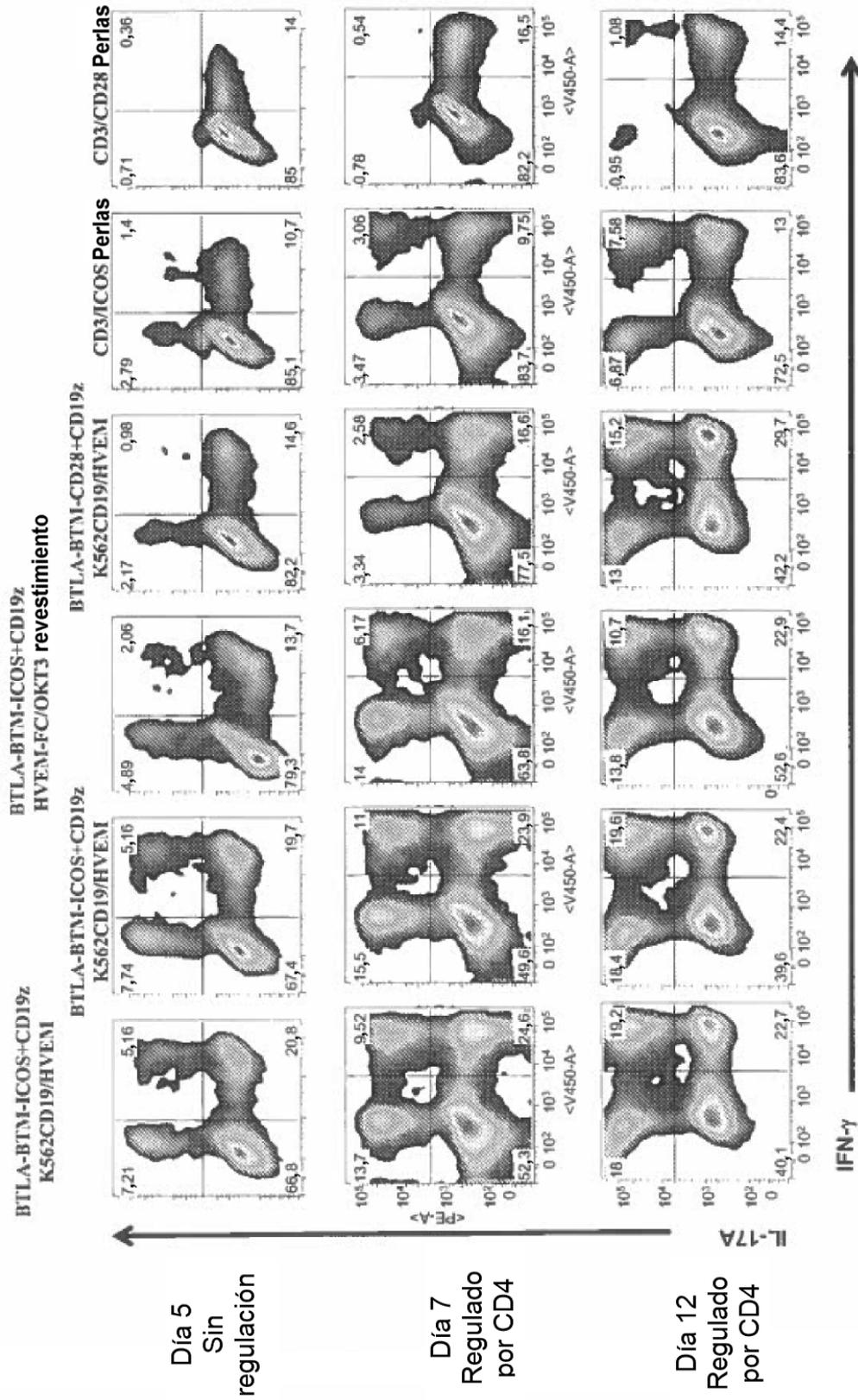


Figura 3B

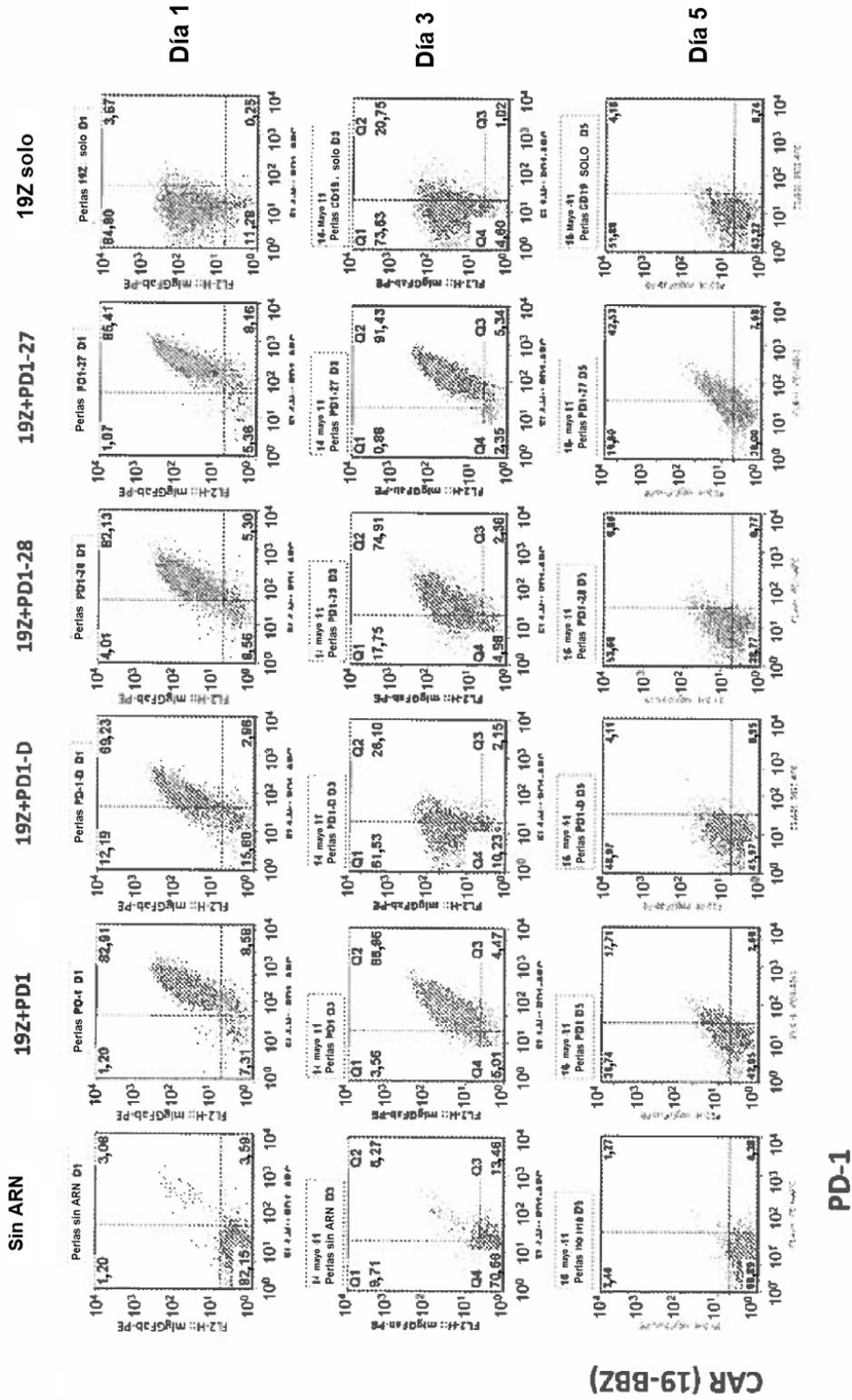


Figura 4A

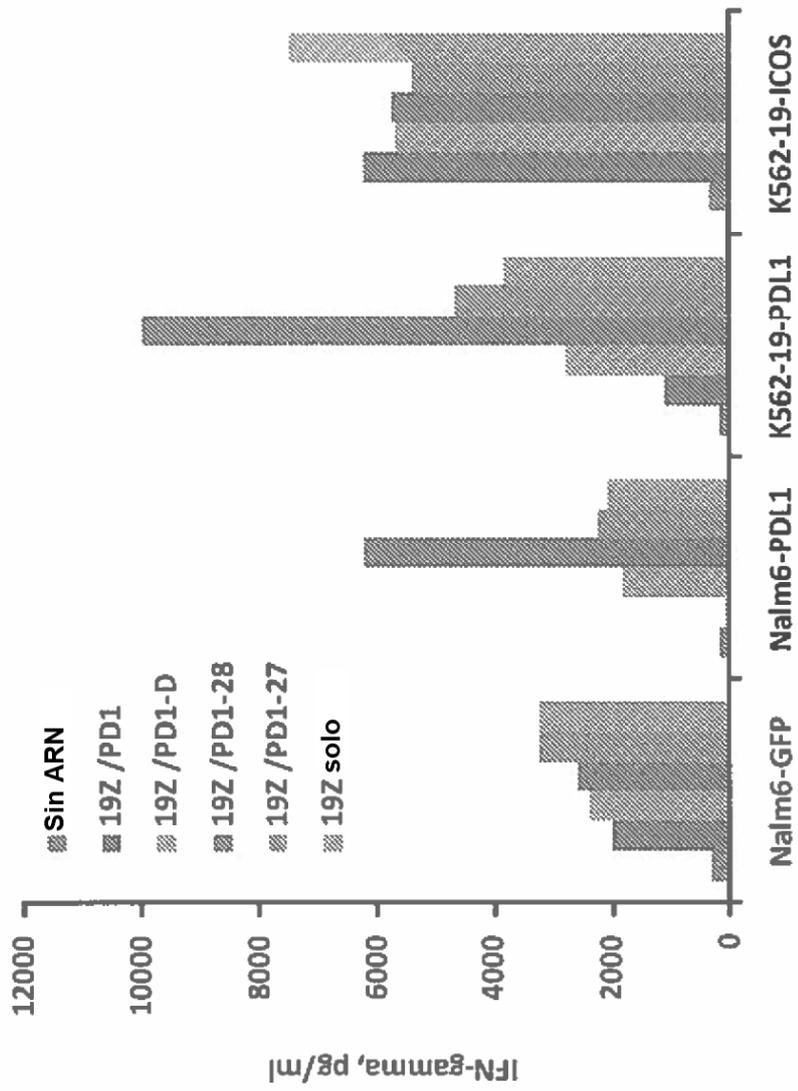


Figura 4B

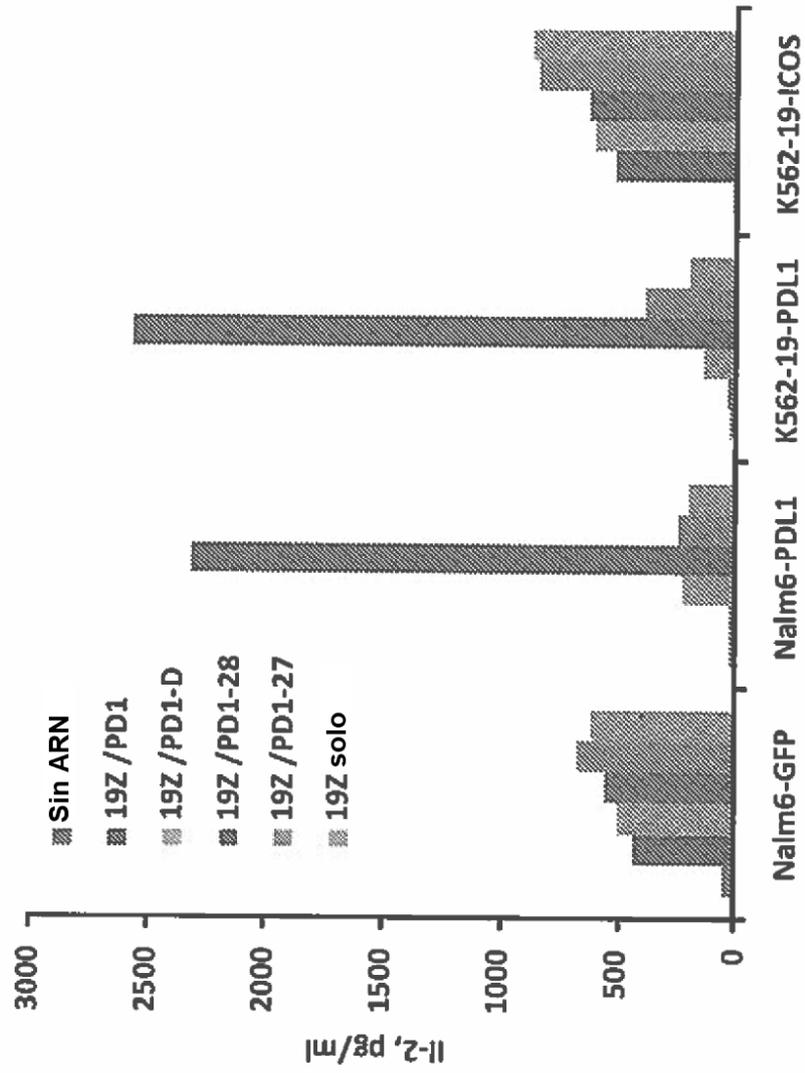


Figura 4C

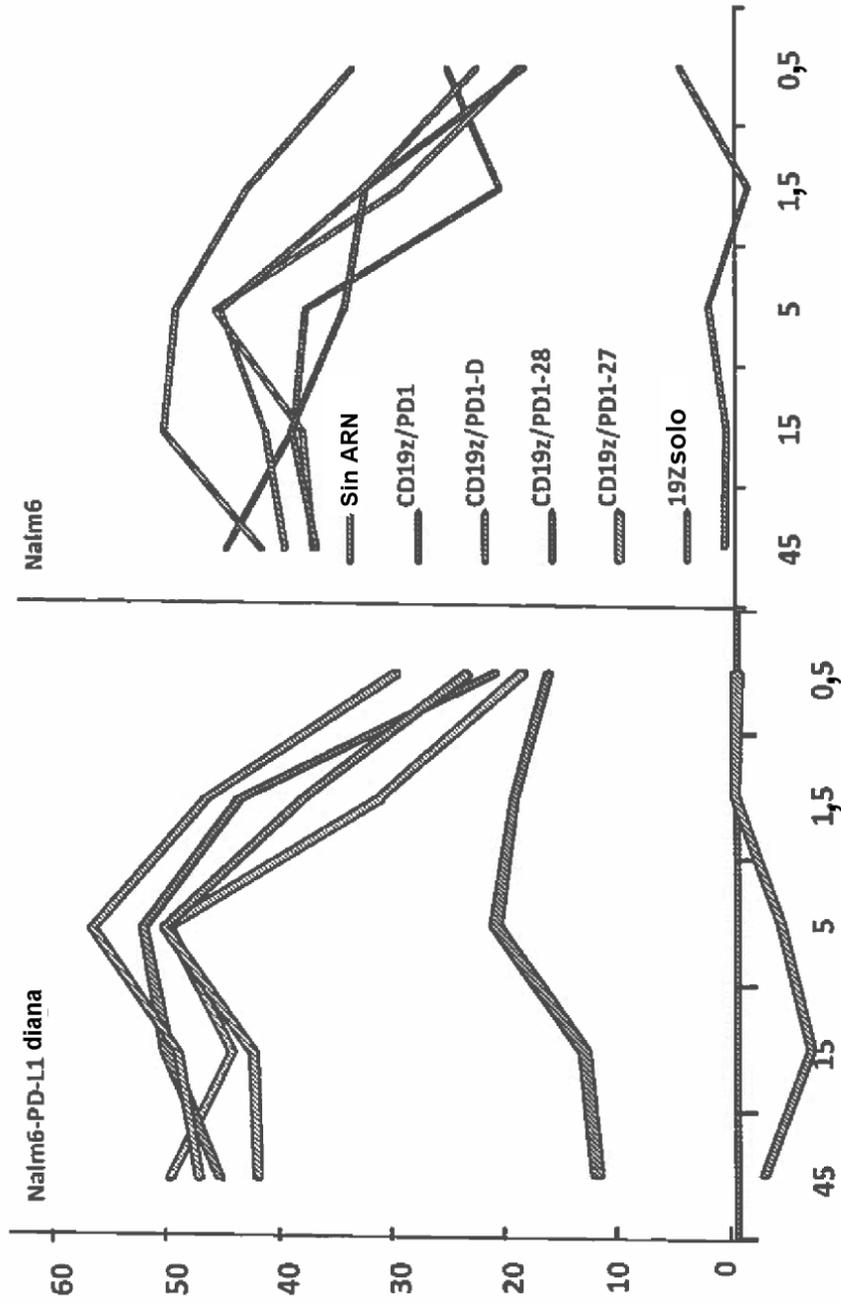


Figura 4D

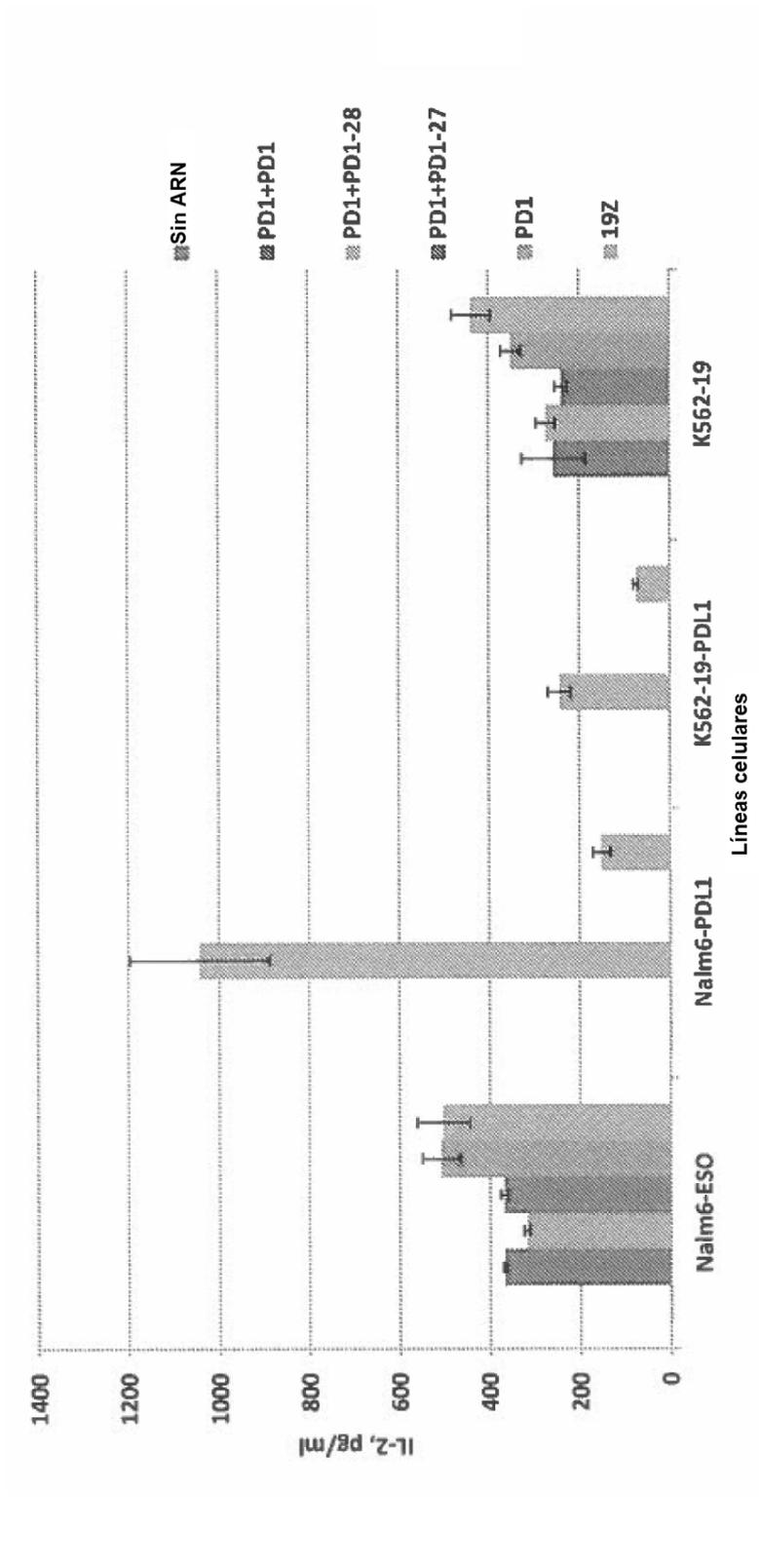


Figura 5B

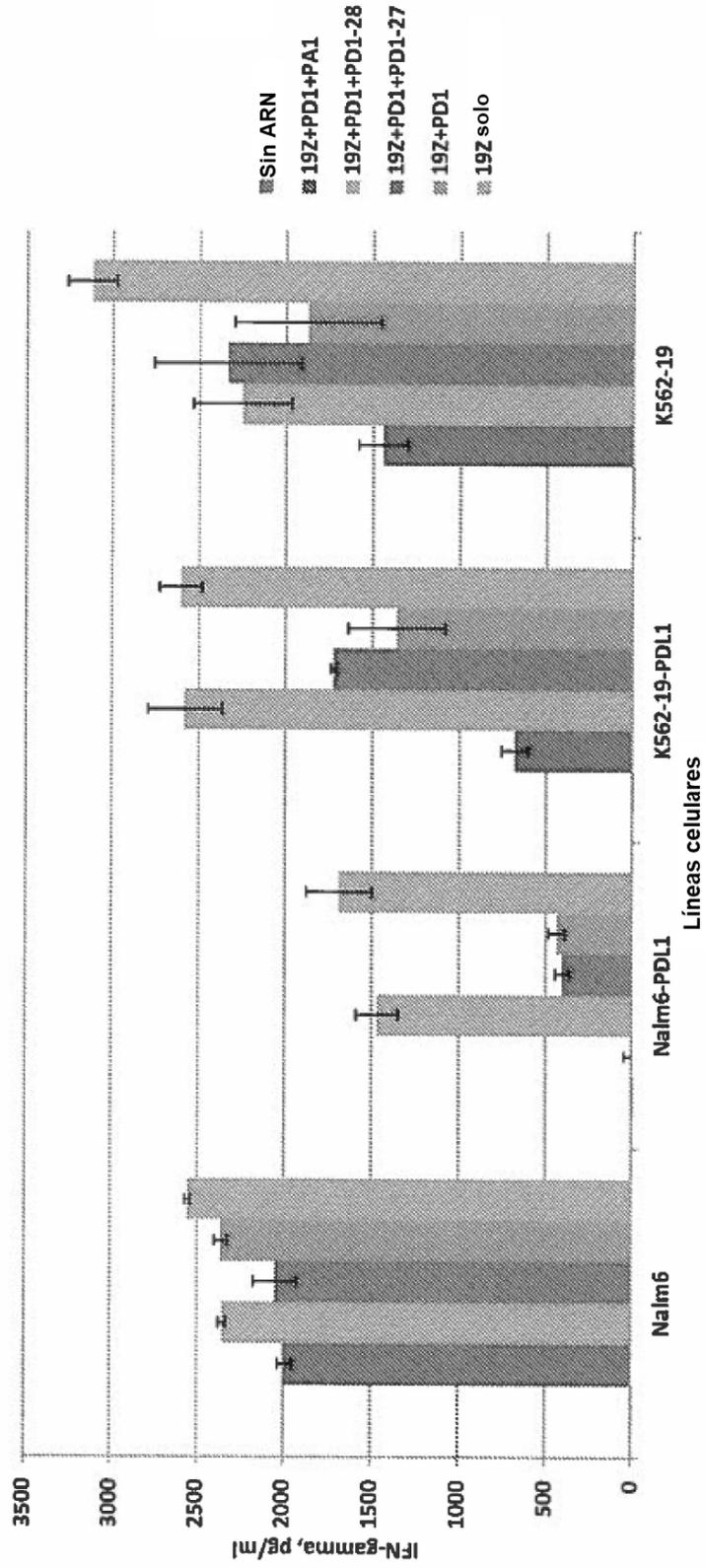


Figura 5C

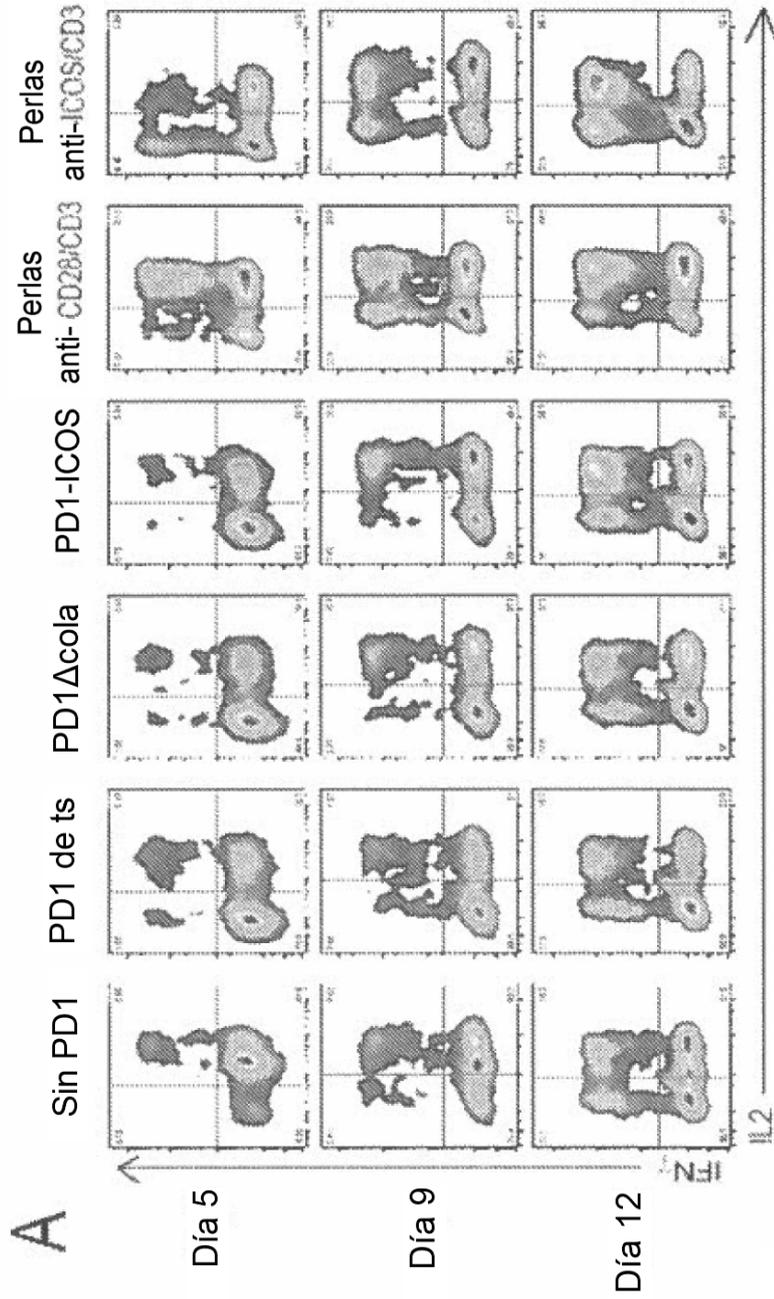


Figura 6A

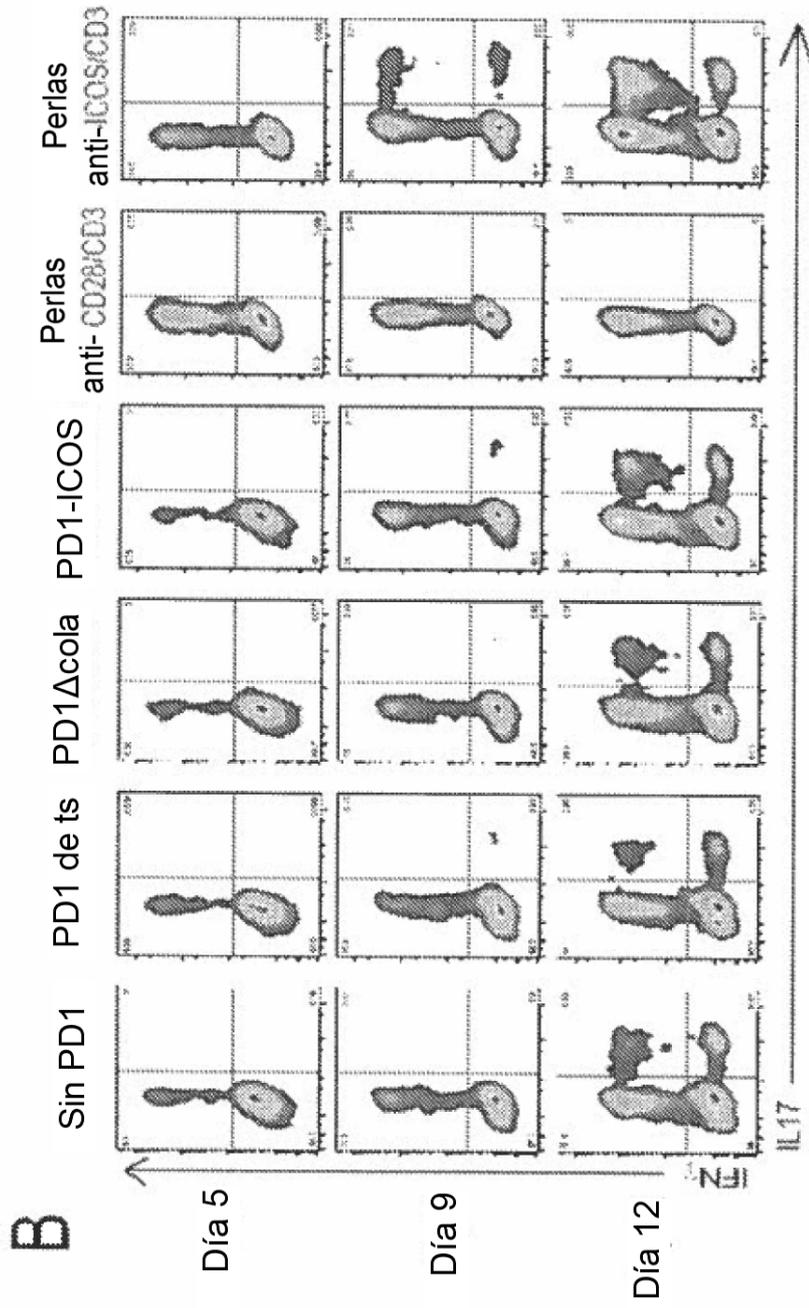


Figura 6B

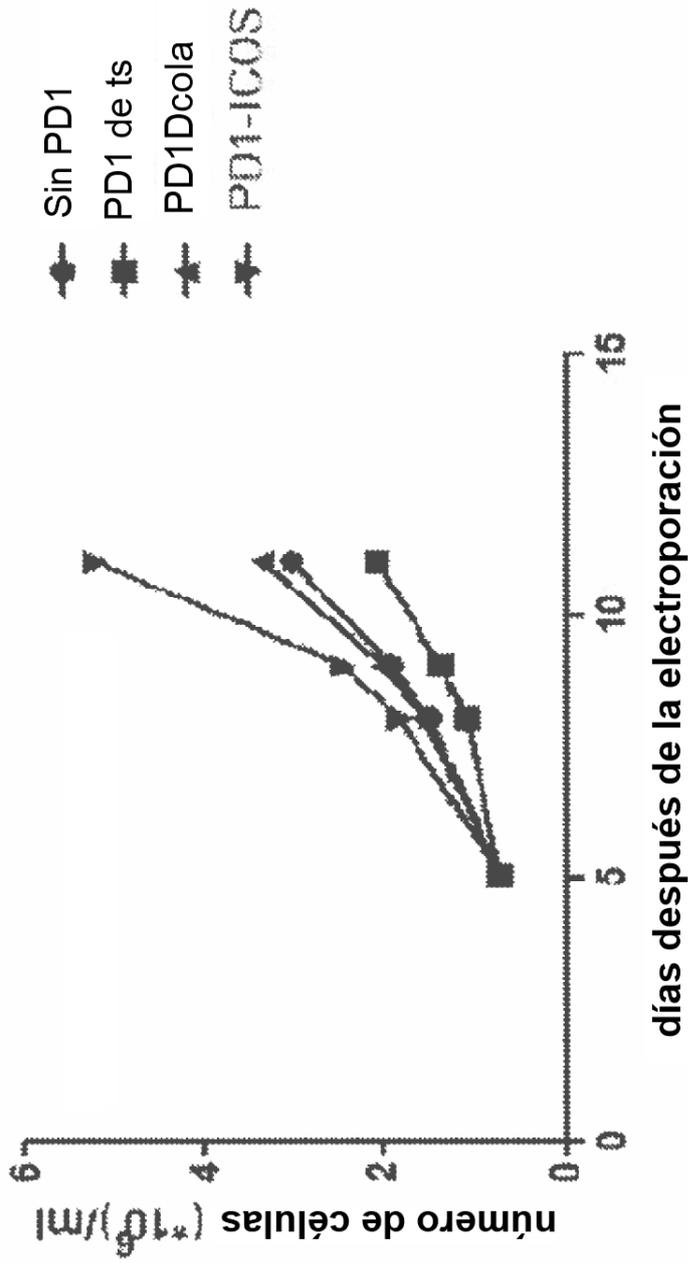


Figura 6C

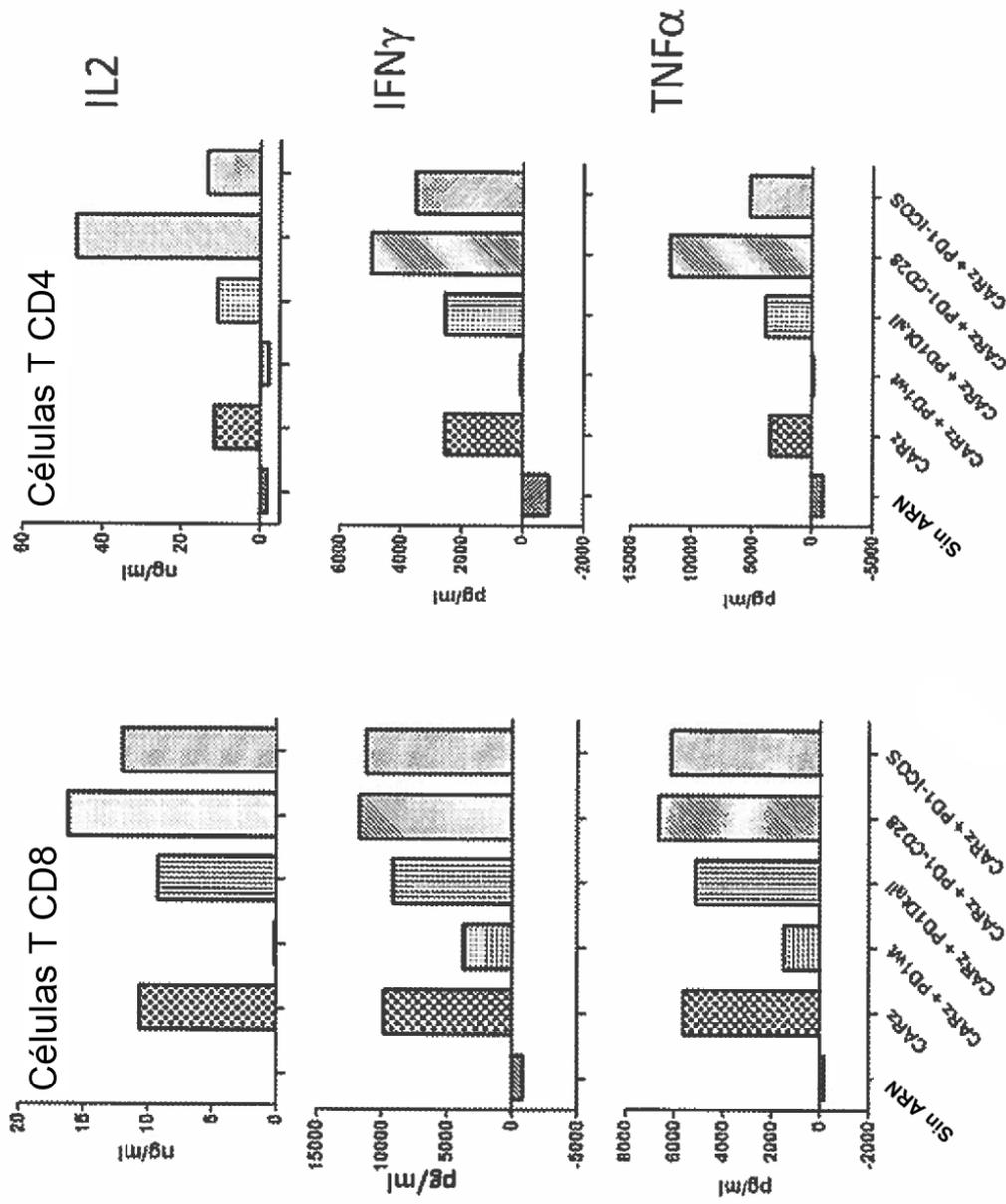


Figura 7

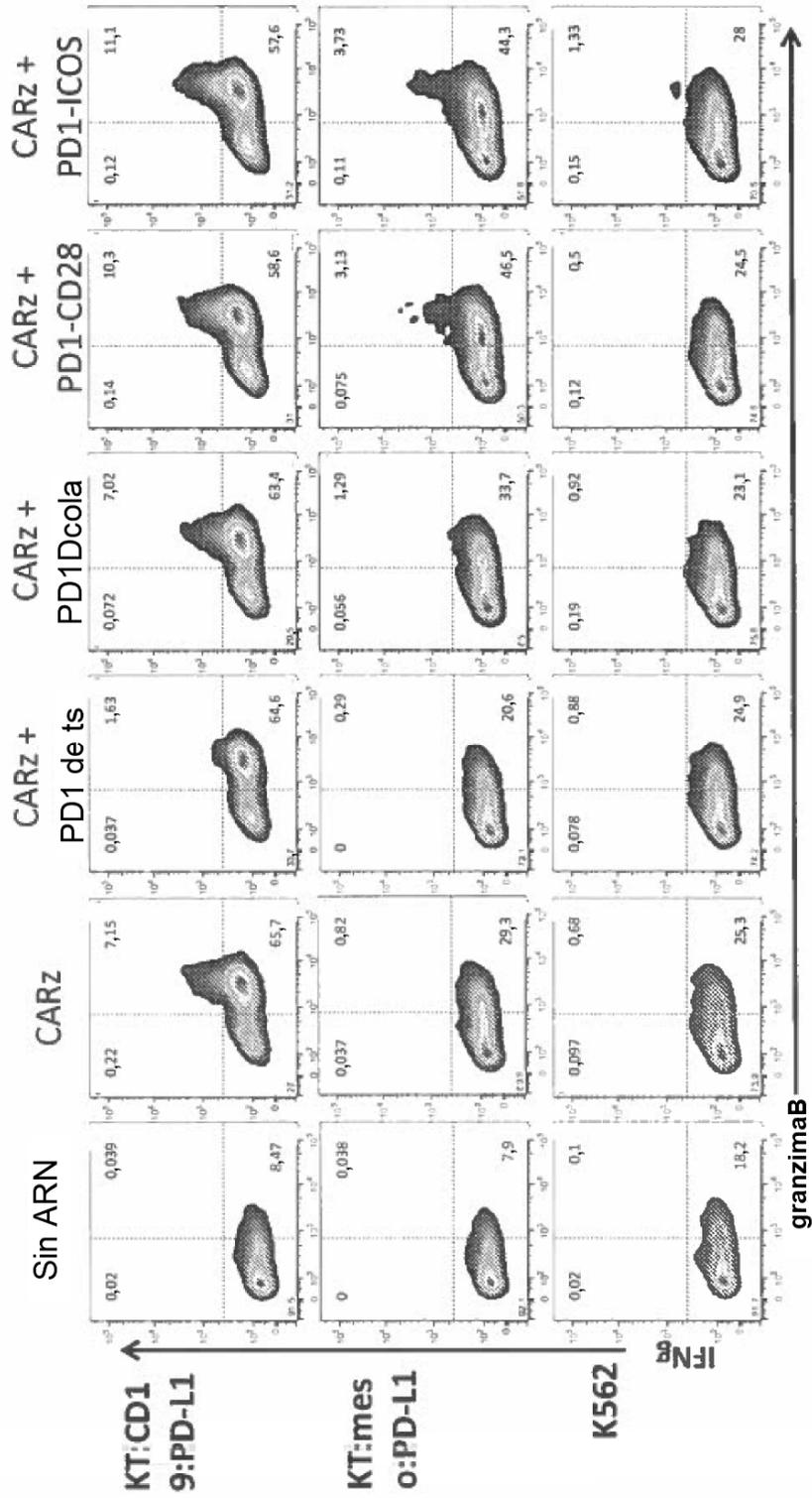


Figura 8

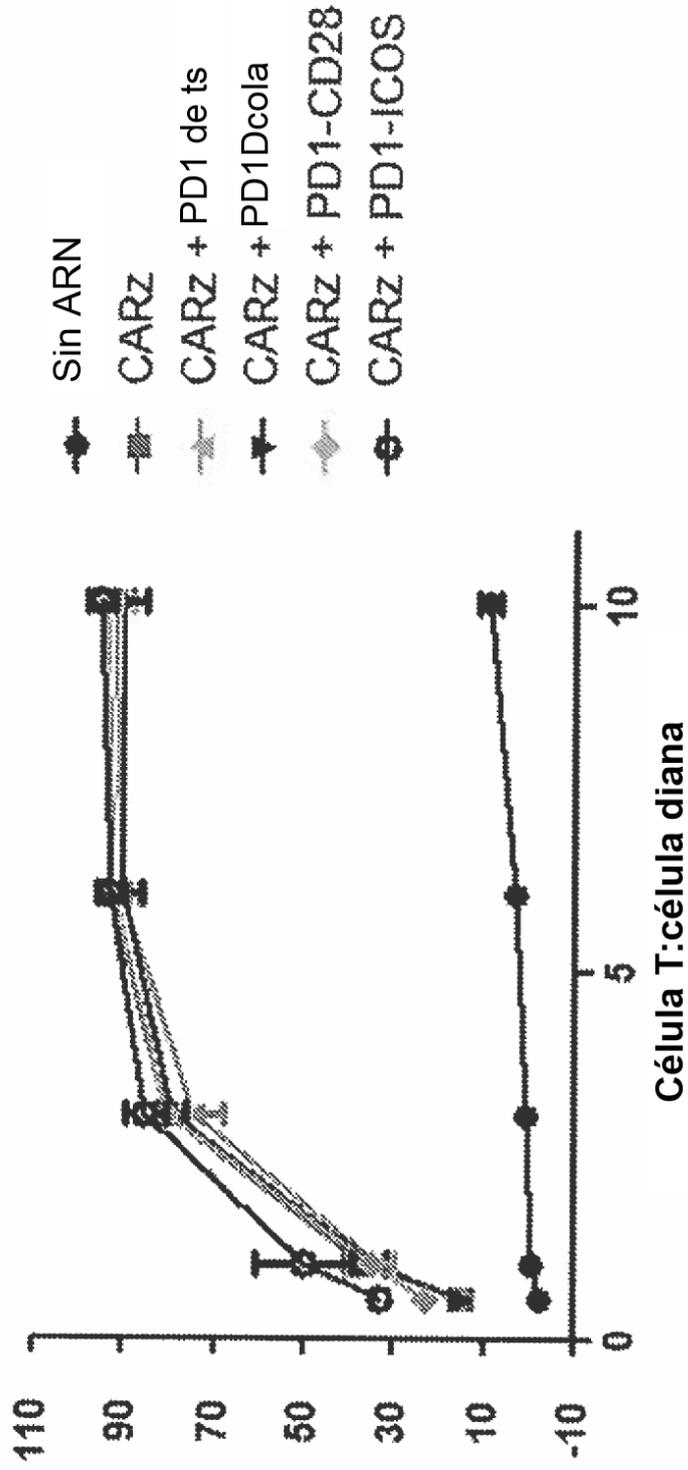


Figura 9

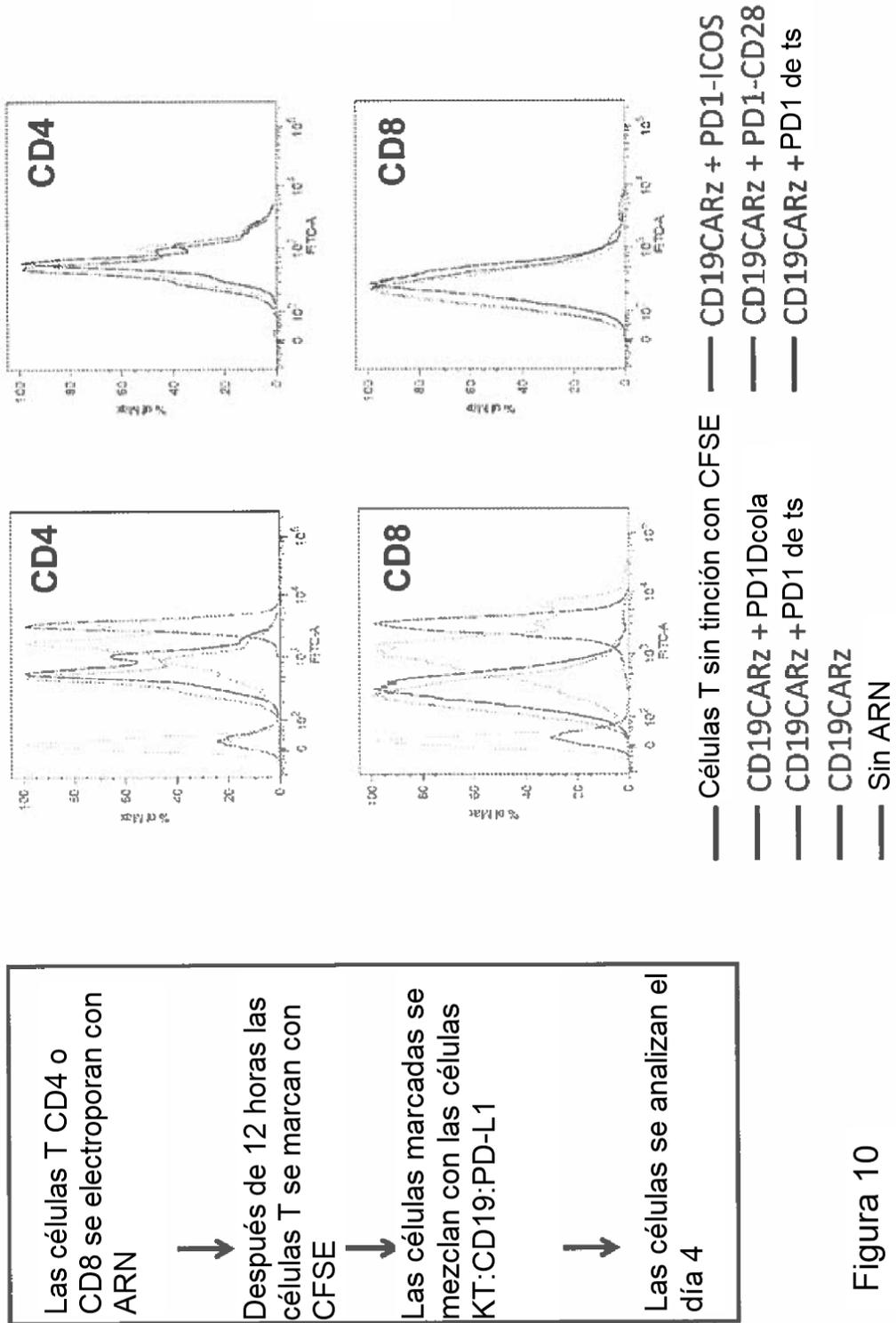


Figura 10

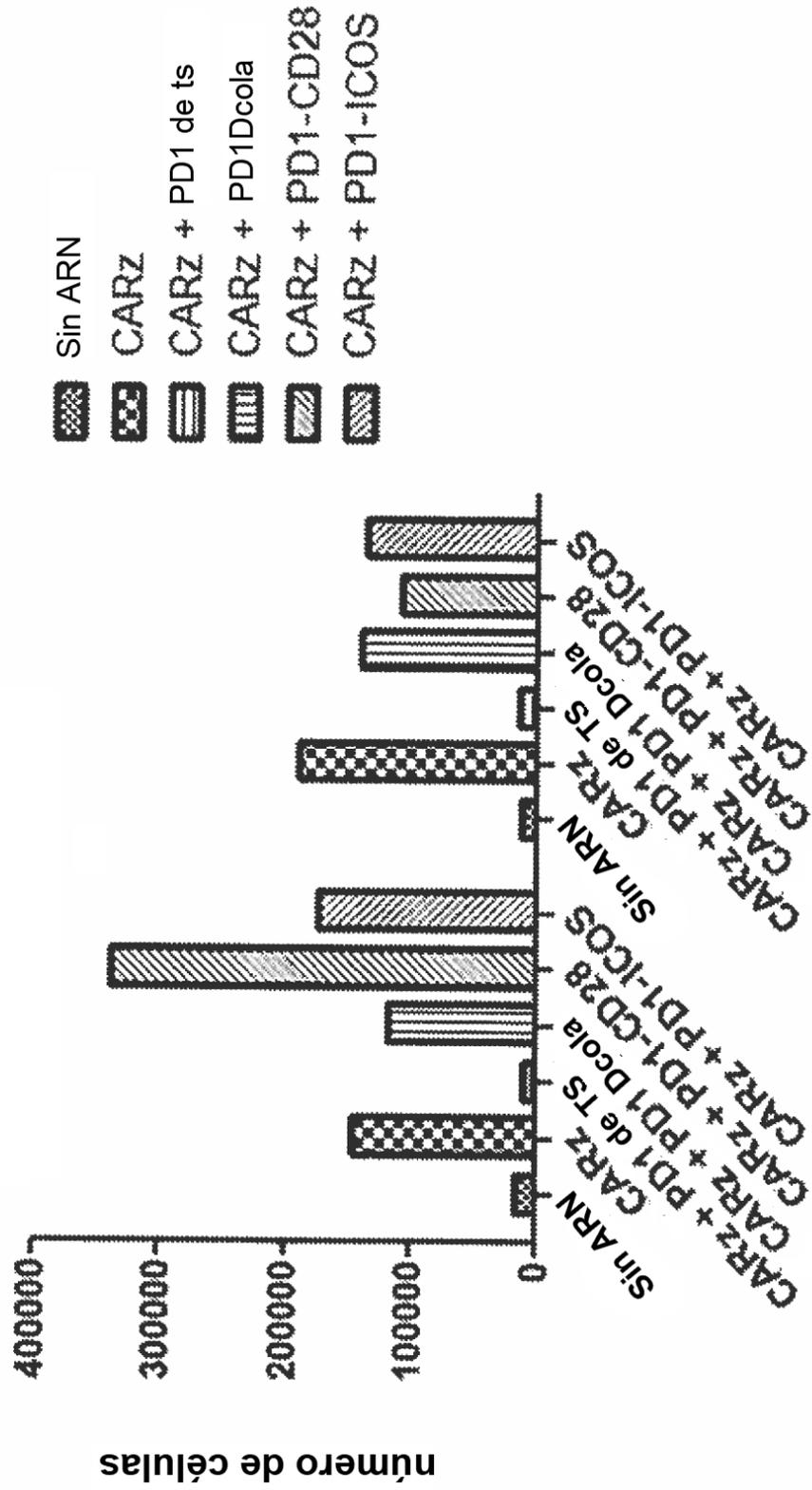


Figura 11