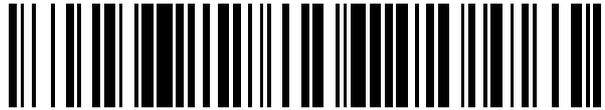


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 525**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2013 PCT/US2013/050287**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14011996**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2013 E 13817548 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2872533**

54 Título: **Métodos para evaluar la adecuación de los linfocitos T transducidos para su administración**

30 Prioridad:

13.07.2012 US 201261671495 P

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

29.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JUNE, CARL, H.;
LEVINE, BRUCE, L. y
KALOS, MICHAEL, D.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 733 525 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

Métodos para evaluar la adecuación de los linfocitos T transducidos para su administración

5 Antecedentes de la invención

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

15 Mientras que los CAR pueden desencadenar la activación de células T de una manera similar a un receptor endógeno de células T, un impedimento importante para la aplicación clínica de esta tecnología hasta la fecha ha sido la limitada expansión in vivo de las células T CAR+, la rápida desaparición de la células después de la infusión y actividad clínica decepcionante (Jena, et al., Blood, 2010, 116: 1035-1044; Uckun, et al. Blood, 1988, 71: 13-29). Los métodos para generar células T modificadas genéticamente para la administración a humanos tienen el potencial de producir contaminantes no deseados que pueden afectar negativamente la persistencia y la función de las células T modificadas genéticamente después de la administración.

20 Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de analizar las células T transducidas para determinar su idoneidad para la administración a un sujeto humano, a través de la detección de contaminantes que pueden afectar negativamente la persistencia y la función de las células modificadas genéticamente. La presente invención aborda esta necesidad.

30 Resumen de la invención

La invención proporciona un método para analizar una célula T modificada genéticamente para detectar un contaminante, en donde la célula T modificada genéticamente comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora, y un dominio de señalización, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

35 En una realización, las células T modificadas genéticamente se modificaron genéticamente mediante transducción con un vector lentiviral.

40 En una realización, el contaminante es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en endotoxina, micoplasma, lentivirus competente para la replicación (RCL), p24, ácido nucleico de VSV-G, gag del VIH, anti-CD3 / residual/ perlas recubiertas de anti-CD28, anticuerpos de ratón, suero humano agrupado, albúmina de suero bovino, suero bovino, componentes de medios de cultivo, células de empaquetamiento vectorial o componentes de plásmidos, una bacteria y un hongo.

45 En una realización, la bacteria es al menos una seleccionada del grupo que consiste en Alcaligenes faecalis, Candida albicans, Escherichia coli, Haemophilus influenza, Neisseria meningitides, Pseudomonas aeruginoccus, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumonia y Streptococcus pyogenes del grupo A.

50 En una realización, el dominio de señalización es un dominio de señalización zeta CD3.

En una realización, el dominio de unión a antígeno es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

55 En una realización, el fragmento de unión a antígeno es un Fab o un scFv.

En una realización, el dominio de unión a antígeno se une a un antígeno tumoral.

En una realización, el antígeno tumoral está asociado con una enfermedad maligna hematológica.

60 En una realización, el antígeno tumoral está asociado con un tumor sólido.

En una realización, el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, Glicolípido F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO 1 TCR, MAGE A3 TCR, y cualquier combinación de los mismos.

65 En una realización, la región de señalización coestimuladora comprende el dominio intracelular de una molécula

coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno asociado a la función de linfocitos -1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83, y cualquier combinación de los mismos.

5 En una realización, la célula T modificada genéticamente no se administra a un sujeto humano debido a la identificación y cuantificación del contaminante.

En una realización, la célula T modificada genéticamente no se administra a un sujeto humano porque la cantidad de contaminante es excesiva en comparación con un nivel de control correspondiente.

10

Breve descripción de los dibujos

La siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención se entenderá mejor cuando se lea junto con los dibujos adjuntos. Con el fin de ilustrar la invención, se muestran en los dibujos realizaciones que se prefieren actualmente. Debe entenderse, sin embargo, que la invención no se limita a las distribuciones precisas y a los instrumentos de las realizaciones mostradas en los dibujos.

15

La Figura 1, que comprende las Figuras 1A a 1B, es una serie de imágenes de las representaciones esquemáticas del vector de transferencia génica y el transgén, la fabricación de células T modificadas genéticamente y el diseño del protocolo clínico. La Figura 1A muestra los vectores lentivirales y el transgén que muestran los principales elementos funcionales. Se produjo un vector lentiviral de grado clínico pseudotipado (pELPs 19BBz) del virus de la estomatitis vesicular que dirige la expresión de scFv anti-CD19 derivado del anticuerpo monoclonal murino FMC63, la bisagra CD8 α humana y el dominio transmembrana, y se produjeron los dominios de señalización humana 4-1BB y CD3-zeta. La expresión constitutiva del transgén se dirigió mediante la inclusión de un EF-1 α (promotor del factor-20 la de elongación); LTR, repetición terminal larga; RRE, elemento de respuesta rev, (cPPT) y la secuencia de terminación central (CTS). La figura no está a escala. La Figura 1B muestra la fabricación de células T. Las células autólogas se obtuvieron mediante aféresis, y las células T sin LLC de los sujetos en estudio, se enriquecieron con elutriación de células mononucleares. Para sujetos con LLC, las células de leucemia residual se agotaron mediante la adición de perlas paramagnéticas recubiertas con anti-CD3 / CD28 para la selección positiva y la activación de las células T. Para los sujetos sin LLC, las células elutriadas se lavaron seguidas de la adición de con anti-CD3/perlas paramagnéticas recubiertas de CD28 para la activación de las células T. Se añadió el vector lentiviral en el momento de la activación celular y se lavó el día 3 después del inicio del cultivo. Dos días después, las células se expandieron en un dispositivo de plataforma oscilante (Sistema de bioreactor WAVE) por un período adicional de 3-7 días. En el último día de cultivo, las perlas se eliminaron por paso a través de un campo magnético y las células T CAR19 se recogieron, lavaron y crioconservaron en medio infundible. A los pacientes se les administró quimioterapia con linfodepleción según lo descrito, seguido de la infusión n^o 1 de CART19 mediante goteo por flujo de gravedad i.v. durante un período de tiempo de 15-20 minutos. La infusión se administró mediante un método de dosis divididas durante 3 días (10%, 30%, 60%) comenzando de 1 a 5 días después de completar la quimioterapia. Los ensayos de evaluación se realizaron en la semana de estudio 4. Al finalizar la monitorización activa los sujetos se transfirieron a un protocolo para un seguimiento a largo plazo según las pautas de la FDA.

20

25

30

35

40

La Figura 2 muestra el proceso de fabricación de las células CART-19.

La Figura 3 es una tabla que lista los tipos de análisis realizados en las células T transducidas.

La Figura 4 muestra los resultados de los análisis que cuantifican el ácido nucleico de VSV-G durante el período de cultivo ex vivo.

45

La Figura 5 muestra los resultados de los análisis que cuantifican el ácido nucleico de gag del VIH durante el período de cultivo ex vivo.

Descripción detallada

50

La descripción se refiere a los métodos para producir vectores que comprenden ácidos nucleicos que codifican un receptor de antígeno quimérico (CAR) que son adecuados para la transducción de células T destinadas a la administración a un sujeto humano. La descripción también se refiere a métodos de transducción de células T destinadas a la administración a un sujeto humano con vectores que comprenden ácidos nucleicos que codifican un receptor de antígeno quimérico (CAR). En una realización preferida, el vector es un vector lentiviral. La presente descripción se refiere a la transferencia de células adoptivas de células T transducidas con un vector lentiviral para expresar un CAR. Las CAR son moléculas que combinan la especificidad basada en anticuerpos para un antígeno diana deseado (por ejemplo, antígeno tumoral) con un dominio intracelular que activa el receptor de células T para generar una proteína quimérica que presenta una actividad inmune celular antitumoral específica.

55

60

En algunos casos, la descripción se refiere a métodos para analizar sobrenadantes de vectores útiles para transducir células T destinadas a la administración a un sujeto humano. Los métodos de la invención se refieren a métodos para analizar células T transducidas destinadas a la administración a un sujeto humano. En diversas realizaciones, los métodos de análisis de la invención incluyen métodos para analizar la viabilidad de las células T, el carácter de las células T (por ejemplo, CD3, CD4, CD8, CD25, CD27, CD45RA, CD57, CD62L, CD95, CD127, CD134, CD244, CCR7, CD40L, CTLA4, PD-1, HLA-DR, TIM3, Ki-67, expresión de perforina y/o granzima), la eficiencia de la transducción, así como los métodos de detección y cuantificación de contaminantes asociados con el proceso de

65

fabricación, como la endotoxina, mycoplasma, lentivirus competente para la replicación (RCL), p24, ácido nucleico de VSV-G, gag de VIH, anti-CD3 residual/perlas revestidas de anti-CD28, anticuerpos de ratón, suero humano agrupado, albúmina de suero bovino, suero bovino, componentes de medios de cultivo, células empaquetadoras de vectores o componentes de plásmidos, bacterias (p. ej., *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* grupo A), y hongos. La invención no está limitada a ningún contaminante particular. Más bien, la invención incluye métodos de análisis para cualquier contaminante que afecte la seguridad o eficacia de la célula T transducida.

La presente descripción se refiere en general, al uso de vectores para modificar genéticamente las células T para expresar de manera estable un CAR deseado. Las células T que expresan un CAR se denominan en el presente documento células T CAR o células T CAR modificadas. Preferiblemente, la célula puede modificarse genéticamente para expresar de manera estable un dominio de unión a anticuerpo en su superficie, lo que confiere una nueva especificidad de antígeno que es independiente del MHC. En algunos casos, la célula T se modifica genéticamente para expresar de manera estable un CAR que combina un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico con un dominio intracelular de la cadena CD3-zeta o proteína FcγRI en una única proteína quimérica.

En una realización, el CAR de la invención comprende un dominio extracelular que tiene un dominio de reconocimiento de antígeno, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico. En una realización, se usa el dominio transmembrana que naturalmente está asociado con uno de los dominios en el CAR. En otra realización, el dominio transmembrana puede seleccionarse o modificarse por sustitución de aminoácidos para evitar la unión de tales dominios a los dominios transmembrana de las proteínas de la membrana superficial iguales o diferentes para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor. Preferiblemente, el dominio transmembrana es el dominio de bisagra CD8α.

Con respecto al dominio citoplásmico, el CAR de la invención se puede diseñar para comprender el dominio de señalización CD28 y/o 4-1BB por sí mismo o se puede combinar con cualquier otro dominio citoplásmico deseado útil en el contexto del CAR de la invención. En una realización, el dominio citoplásmico del CAR puede diseñarse para comprender además el dominio de señalización de CD3-zeta. Por ejemplo, el dominio citoplásmico del CAR puede incluir, entre otros, módulos de señalización CD3-zeta, 4-1BB y CD28 y combinaciones de los mismos. Por consiguiente, la invención proporciona células T CAR y métodos de su uso para terapia adoptiva.

La descripción describe métodos para producir un vector que comprende ácidos nucleicos que codifican un CAR anti-CD 19 que incluye tanto CD3-zeta como el dominio coestimulador 4-1BB. En una realización, el vector comprende un CAR deseado, por ejemplo un CAR que comprende anti-CD 19, dominio bisagra CD8α y transmembrana, y dominios de señalización humanos 4-1BB y CD3-zeta. La descripción no se limita a los CAR que comprenden anti-CD 19, sino que también incluye cualquier porción de unión a antígeno fusionado con uno o más dominios intracelulares seleccionados del grupo de un dominio de señalización CD137 (4-1BB), un dominio de señalización CD28, un dominio de señalización CD3zeta, y cualquier combinación de los mismos. En realizaciones preferidas, el vector es un vector lentiviral.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece la invención. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica para probar la presente invención, los materiales y métodos preferidos se describen en el presente documento. Al describir y reivindicar la presente invención, se utilizará la siguiente terminología.

También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir solo realizaciones particulares, y no pretende ser limitante.

Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

"Aproximadamente" tal como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, en algunos casos $\pm 5\%$, en algunos casos $\pm 1\%$, y en algunos casos $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos descritos.

"Activación", tal como se usa en el presente documento, se refiere al estado de una célula T que ha sido suficientemente estimulada para inducir la proliferación celular detectable. La activación también puede estar asociada con la producción inducida de citoquinas y funciones efectoras detectables. El término "células T activadas" se refiere, entre otras cosas, a las células T que están en proceso de división celular.

El término "anticuerpo", tal como se usa 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 porciones inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos son típicamente tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos en la presente invención pueden existir en una variedad de formas que incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, Fv, Fab y F(ab)₂, así como anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos humanizados (Harlow et al., 1999, en: Using antibodies: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, en: Antibodies: A laboratory manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242: 423-426).

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

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

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

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

El término "antígeno" o "Ag" como se usa 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 específicas, o ambas. El experto en la materia entenderá que cualquier macromolécula, que incluye virtualmente todas las proteínas o péptidos, puede servir como un antígeno. Además, los antígenos pueden derivarse 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 provoca una respuesta inmune, codifica un "antígeno" tal como se usa ese término en este documento. Además, un experto en la técnica entenderá que un antígeno no necesita estar codificado únicamente 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 varias combinaciones para provocar la respuesta inmune deseada. Además, un experto en la técnica entenderá que un antígeno no necesita estar codificado por un "gen" en absoluto. Es evidente que un antígeno puede generarse de forma sintética o puede derivarse de una muestra biológica. Dicha muestra biológica puede incluir, pero no se limita a una muestra de tejido, una muestra de tumor, una célula o un fluido biológico.

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

El término "autoantígeno" significa, de acuerdo con la presente invención, cualquier autoantígeno que el sistema inmunitario reconozca erróneamente como extraño. Los autoantígenos comprenden, pero no se limitan a, proteínas celulares, fosfoproteínas, proteínas de la superficie celular, lípidos celulares, ácidos nucleicos, glicoproteínas, incluidos los receptores de la superficie celular.

El término "enfermedad autoinmune" tal como se usa en el presente documento se define como un trastorno que resulta de una respuesta autoinmune. Una enfermedad autoinmune es el resultado de una respuesta inadecuada y excesiva a un autoantígeno. Los ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen, entre otros, la enfermedad de Addison, la alopecia areata, la espondilitis anquilosante, la hepatitis autoinmune, la parotitis autoinmune, la enfermedad de Crohn, la diabetes (tipo I), la epidermólisis ampollar distrofica, la epididimitis, la glomerulonefritis, la enfermedad de Graves, el síndrome Guillain-Barré, la enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia grave, pénfigo vulgar, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, escleroderma, síndrome de Sjogren, espondiloartropatías, tiroiditis, vasculitis, vitiligo,

mixedema, anemia perniciosa, colitis ulcerosa, entre otras..

Tal como se usa en el presente documento, el término "autólogo" se refiere a cualquier material derivado del mismo individuo al cual se reintroducirá posteriormente en el individuo.

5

"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.

10 El término "cáncer", como se usa en el presente documento, se define como una enfermedad caracterizada por el crecimiento rápido e incontrolado de células aberrantes. Las células cancerosas se pueden diseminar localmente o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. Los ejemplos de varios tipos de cáncer incluyen, entre otros, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer cerebral, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y similares.

15

El "ligando coestimulador", tal como se usa en el presente documento, incluye una molécula en una célula presentadora de antígeno (por ejemplo, una aAPC, una célula dendrítica, una célula B y similares) que se une específicamente a una molécula coestimuladora afín en una célula T, proporcionando así una señal que, además de la señal primaria proporcionada, por ejemplo, por la unión de un complejo TCR/CD3 con una molécula de MHC cargada con péptido, media una respuesta de células T, que incluye, pero que no se limita a, proliferación, activación, diferenciación, y similares. Un ligando coestimulador puede incluir, pero no está limitado a, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulador inducible (ICOSL), molécula de adhesión intercelular (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor beta de linfotoxina, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, un agonista o anticuerpo que se une al receptor del ligando Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3. Un ligando coestimulador también abarca, entre otras cosas, un anticuerpo que se une específicamente con una molécula coestimuladora presente en una célula T, como, por ejemplo, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno-1 asociado a la función de los linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83.

20

25

30

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

35

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

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

40

45

Una "cantidad efectiva", como se usa en el presente documento, significa una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico o profiláctico.

"Codificación" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, que sirven como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia de nucleótidos (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de los mismos. 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 la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia del ARNm y generalmente se proporciona en listas de secuencias, y la cadena no codificadora, utilizada como plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, puede decirse que codifica la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

50

55

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

60

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

El término "expresión" como se usa en el presente documento se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos particular dirigida por su promotor.

65

- 5 "Vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de la expresión operativamente unidas a una secuencia de nucleótidos para expresarse. Un vector de expresión comprende suficientes elementos que actúan en cis para la expresión; Otros elementos para la expresión pueden ser suministrados por la célula huésped o en un sistema de expresión in vitro. Los vectores de expresión incluyen todos aquellos conocidos en la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus (por ejemplo, lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus asociados a adenovirus) que incorporan el polinucleótido recombinante.
- 10 "Homólogo" se refiere a la similitud de secuencia o identidad de secuencia entre dos polipéptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. Cuando una posición en ambas de las dos secuencias comparadas está ocupada por la misma base o subunidad de monómero de aminoácido, por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. El porcentaje de homología entre dos secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las dos secuencias divididas por el número de posiciones comparadas con X 100. Por ejemplo, si 6 de las 10 posiciones en dos secuencias son coincidentes u homólogas entonces las dos secuencias son homólogas al 60%. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN ATTGCC y TATGGC comparten una homología del 50%. En general, se hace una comparación cuando dos secuencias se alinean para dar una homología máxima.
- 15 El término "inmunoglobulina" o "Ig", tal como se usa en el presente documento, se define como una clase de proteínas, que funcionan como anticuerpos. Los anticuerpos expresados por las células B a veces se denominan BCR (receptor de células B) o receptor de antígeno. Los cinco miembros incluidos en esta clase de proteínas son IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. La IgA es el anticuerpo primario que está presente en las secreciones corporales, como la saliva, las lágrimas, la leche materna, las secreciones gastrointestinales y las secreciones de moco de las vías respiratorias y genitourinarias. IgG es el anticuerpo circulante más común. La IgM es la principal inmunoglobulina producida en la respuesta inmune primaria en la mayoría de los sujetos. Es la inmunoglobulina más eficiente en aglutinación, fijación del complemento y otras respuestas de anticuerpos, y es importante en la defensa contra bacterias y virus. La IgD es la inmunoglobulina que no tiene una función de anticuerpo conocida, pero puede servir como un receptor de antígeno. La IgE es la inmunoglobulina que media la hipersensibilidad inmediata al causar la liberación de mediadores de los mastocitos y basófilos al exponerse al alérgeno.
- 20 Como se usa en el presente documento, un "material de instrucción" incluye una publicación, un registro, un diagrama, o cualquier otro medio de expresión que se puede usar para comunicar la utilidad de las composiciones y métodos de la invención. El material de instrucción del kit de la invención puede, por ejemplo, fijarse a un contenedor que contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición de la invención o enviarse junto con un contenedor que contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición. Alternativamente, el material de instrucción puede enviarse por separado del contenedor con la intención de que el receptor utilice el material de instrucción y el compuesto de forma cooperativa.
- 25 "Aislado" significa alterado o eliminado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido naturalmente presente en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico o péptido está parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural "aislado". Un ácido nucleico o proteína aislado puede existir en forma sustancialmente purificada, o puede existir en un entorno no nativo tal como, por ejemplo, una célula huésped.
- 30 En el contexto de la presente invención, se usan las siguientes abreviaturas para las bases de ácidos nucleicos que se producen comúnmente. "A" se refiere a la adenosina, "C" se refiere a la citosina, "G" se refiere a la guanosina, "T" se refiere a la timidina, y "U" se refiere a la uridina.
- 35 Un "lentivirus" tal como se usa en el presente documento se refiere a un género de la familia Retroviridae. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus al ser capaces de infectar células que no se dividen; pueden entregar una cantidad significativa de información genética al ADN de la célula huésped, por lo que son uno de los métodos más eficientes de un vector de administración de genes. VIH, SIV y FIV son todos ejemplos de lentivirus. Los vectores derivados de los lentivirus ofrecen los medios para lograr niveles significativos de transferencia de genes in vivo.
- 40 Por el término "modulación", como se usa en este documento, se entiende un aumento o disminución detectable en el nivel de una respuesta en un sujeto en comparación con el nivel de una respuesta en el sujeto en ausencia de un tratamiento o compuesto, y/o en comparación con el nivel de una respuesta en un sujeto por lo demás idéntico pero no tratado. El término abarca perturbar y/o afectar una señal o respuesta nativa, mediando así una respuesta terapéutica beneficiosa en un sujeto, preferiblemente, un ser humano.
- 45 A menos que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.
- 50 El término "unido operativamente" se refiere al enlace funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácido nucleico heteróloga que da como resultado la expresión de esta última. Por ejemplo, una primera secuencia de

ácido nucleico está unida operativamente con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia de codificación si el promotor afecta la transcripción o expresión de la secuencia de codificación. En general, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y, cuando sea necesario para unir dos regiones codificantes de proteínas, en el mismo marco de lectura.

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

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

Los términos "paciente", "sujeto", "individuo" y similares se usan indistintamente en el presente documento, y se refieren a cualquier animal, o a sus células, ya sea in vitro o in situ, conforme a los métodos descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones no limitativas, el paciente, sujeto o individuo es un humano.

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

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

El término "promotor" como se usa en este documento se define como una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, requerida para iniciar la transcripción específica de una secuencia de polinucleótidos.

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

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

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

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

Por el término "se une específicamente", como se usa en este documento con respecto a un anticuerpo, se entiende un anticuerpo que reconoce un antígeno específico, pero no reconoce o se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de una especie también puede unirse a ese antígeno de una o más especies. Pero, tal reactividad de especies cruzadas no altera la clasificación de un anticuerpo como específico. En otro ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno también puede unirse a diferentes formas alélicas del antígeno. Sin embargo, tal reactividad cruzada no altera la clasificación de un anticuerpo como específico. En algunos casos, los términos "unión específica" o "se une específicamente" se pueden usar en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, para significar que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o epítipo) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura de proteína específica en lugar de proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epítipo "A", la presencia de una molécula que contenga el epítipo A (o A libre, no marcada), en una reacción que contenga la etiqueta "A" y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcada que se une al anticuerpo .

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

Una "molécula estimuladora", como se usa en este documento, significa una molécula en una célula T que se une específicamente con un ligando estimulador relacionado presente en una célula presentadora de antígeno.

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

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

Tal como se usa 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 normalmente está asociada en su estado natural. En algunos casos, una población de células sustancialmente purificadas se refiere a una población homogénea de células. En otros casos, este término se refiere simplemente a las células que se han separado de las células con las que están naturalmente asociadas en su estado natural. En algunas realizaciones, las células se cultivan in vitro. En otras realizaciones, las células no se cultivan in vitro.

El término "terapéutico" tal como se usa en este documento significa un tratamiento y/o profilaxis. Un efecto terapéutico se obtiene mediante la supresión, remisión o erradicación de un estado de enfermedad.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del compuesto sujeto que provocará la respuesta médica o biológica de un tejido, sistema o sujeto que está buscando el investigador, veterinario, médico u otro clínico. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" incluye la cantidad de un compuesto que, cuando se administra, es suficiente para prevenir el desarrollo o aliviar, en cierta medida, uno o más de los signos o síntomas del trastorno o enfermedad que se está tratando. La cantidad terapéuticamente efectiva variará dependiendo del compuesto, la enfermedad y su gravedad y la edad, peso, etc., del sujeto a tratar.

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

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

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

Un "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que se puede usar para

administrar un ácido nucleico al interior de una célula. Se conocen numerosos vectores en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfífilos, plásmidos y virus. Por lo tanto, el término "vector" incluye un plásmido que se replica de forma autónoma o un virus. También se debe interpretar que el término incluye compuestos no plásmidos y no virales que facilitan la transferencia de ácido nucleico a las células, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas y similares. Los ejemplos de vectores virales incluyen, pero no se limitan a, vectores adenovirales, vectores de virus adenoasociados, vectores retrovirales y similares.

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

Descripción

La presente invención proporciona métodos para analizar células T transducidas, y sus sobrenadantes, destinados a la administración a un sujeto humano. En diversas realizaciones, los métodos de análisis de la invención incluyen métodos para analizar la viabilidad de las células T, el carácter de las células T (por ejemplo, expresión de CD3, CD4, CD8, CD25, CD27, CD45RA, CD57, CD62L, CD95, CD127, CD134, CD244, CCR7, CD40L, CTLA4, PD-1, HLA-DR, TIM3, Ki-67, perforina y/o granzima), eficiencia de transducción, la presencia y cantidad de endotoxinas, la presencia y cantidad de micoplasma, la presencia y cantidad de lentivirus competente para la replicación (RCL), la presencia y cantidad de p24, la presencia y cantidad de ácido nucleico y/o proteína derivada de cada uno de los plásmidos utilizados para empaquetar el plásmido de lentivirus, la presencia y cantidad de ácido nucleico de VSV-G y/o proteína, gag de VIH, perlas recubiertas de anti-CD3/anti-CD28 residual, anticuerpos de ratón, suero humano combinado, albúmina de suero bovino, suero bovino, componentes de medios de cultivo, células de empaquetamiento vectorial o componentes de plásmidos, la presencia y cantidad de bacterias (por ejemplo, *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* grupo A), o productos bacterianos que activan y/o modulan el sistema inmunitario (por ejemplo, LPS, ácido nucleico, ARN, etc.) y la presencia y cantidad de hongos.

En algunas realizaciones, el sujeto humano puede tener cáncer. En diversas realizaciones, el cáncer puede ser un tumor maligno hematológico, un tumor sólido, un tumor primario o un tumor de metástasis. Preferiblemente, el cáncer es un tumor maligno hematológico y, más preferiblemente, el cáncer es la leucemia linfocítica crónica (LLC). Otras enfermedades tratables usando las composiciones y métodos de la invención incluyen infecciones virales, bacterianas y parasitarias, así como enfermedades autoinmunes.

En una realización, el vector comprende secuencias de ácido nucleico que codifican un CAR, en donde cuando el CAR se expresa por una célula T, la célula T CAR presenta una propiedad antitumoral. El CAR puede diseñarse para comprender un dominio extracelular que tiene un dominio de unión a antígeno fusionado con un dominio de señalización intracelular de la cadena zeta del complejo receptor de antígeno de células T (por ejemplo, CD3 zeta). El CAR, cuando se expresa en una célula T, es capaz de redirigir el reconocimiento del antígeno en función de la especificidad de unión al antígeno. Un antígeno ejemplar es CD 19 porque este antígeno se expresa en células B malignas. Sin embargo, la invención no se limita a un CAR que reconoce CD19. Más bien, la invención incluye cualquier porción de unión a antígeno que, cuando se une a su antígeno afín, afecta a una célula tumoral, por lo que la célula tumoral no crece, se le pide que muera, o de lo contrario se ve afectada, de modo que la carga tumoral en un paciente disminuye o desaparece. La porción de unión al antígeno se fusiona preferiblemente con un dominio intracelular de una o más de una molécula coestimuladora y una cadena zeta. Preferiblemente, la porción de unión a antígeno se fusiona con uno o más dominios intracelulares seleccionados del grupo de un dominio de señalización CD137 (4-1BB), un dominio de señalización CD28, un dominio de señalización CD3-zeta y cualquier combinación de los mismos.

En una realización, el vector de la invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de señalización CD137 (4-1BB). Esto se debe a que las respuestas de células T mediadas por CAR se pueden mejorar aún más con la adición de dominios coestimuladores. Por ejemplo, la inclusión del dominio de señalización CD137 (4-1BB) aumenta significativamente la actividad antitumoral y la persistencia in vivo de las células T CAR en comparación con una célula T CAR por lo demás no diseñadas para expresar CD137 (4-1BB). Los métodos para modificar genéticamente las células T con CAR se describen en el documento WO 2012/079000.

Composición

La presente descripción proporciona un vector que comprende ácidos nucleicos que codifican un CAR, en donde el

CAR comprende un dominio extracelular e intracelular. El dominio extracelular comprende un elemento de unión específico de la diana, denominado también una porción de unión a antígeno. El dominio intracelular o, de lo contrario, el dominio citoplásmico comprende una región de señalización coestimuladora y una parte de cadena zeta. La región de señalización coestimuladora se refiere a una parte del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de la superficie celular distintas de los receptores de antígenos o sus ligandos que se requieren para una respuesta eficiente de los linfocitos al antígeno.

Entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana del CAR, o entre el dominio citoplásmico y el dominio transmembrana del CAR, se puede incorporar un dominio espaciador. Como se usa en este documento, el término "dominio espaciador" generalmente significa cualquier oligopéptido o polipéptido que funciona para enlazar el dominio transmembrana a, ya sea el dominio extracelular o el dominio citoplásmico en la cadena polipeptídica. Un dominio espaciador puede comprender hasta 300 aminoácidos, preferiblemente de 10 a 100 aminoácidos y lo más preferiblemente de 25 a 50 aminoácidos.

Porción de unión a antígeno

En una realización, el vector comprende un ácido nucleico que codifica un CAR, en el que el CAR comprende un elemento de unión específico a la diana, denominado también una porción de unión al antígeno. La elección de la porción depende del tipo y número de ligandos que definen la superficie de una célula diana. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno puede elegirse para reconocer un ligando que actúa como un marcador de superficie celular en células diana asociadas con un estado de enfermedad particular. Por lo tanto, los ejemplos de marcadores de superficie celular que pueden actuar como ligandos para el dominio de la porción de antígeno en el CAR de la invención incluyen aquellos asociados con infecciones virales, bacterianas y parasitarias, enfermedades autoinmunes y células cancerosas.

En una realización, el vector comprende un ácido nucleico que codifica un CAR, en el que el CAR está diseñado para localizar un antígeno tumoral de interés mediante la ingeniería de una porción de unión al antígeno deseado que se une específicamente a un antígeno en una célula tumoral. En el contexto de la presente invención, "antígeno tumoral" o "antígeno del trastorno hiperproliferativo" o "antígeno asociado con un trastorno hiperproliferativo", se refiere a antígenos que son comunes a trastornos hiperproliferativos específicos tales como el cáncer. Los antígenos descritos en este documento se incluyen simplemente a modo de ejemplo. La lista no pretende ser exclusiva, y otros ejemplos serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

Los antígenos tumorales son proteínas que son producidas por células tumorales que provocan una respuesta inmune, particularmente respuestas inmunes mediadas por células T. La selección de la porción de unión a antígeno de la invención dependerá del tipo particular de cáncer a tratar. Los antígenos tumorales son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, un antígeno asociado a glioma, antígeno carcinoembrionario (CEA), gonadotropina coriónica β humana, alfafetoproteína (AFP), AFP reactiva a lectina, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CA IX, transcriptasa inversa de telomerasa humana, RU1, RU2 (AS), carboxil esterasa intestinal, mut hsp70-2, M-CSF, prostasa, antígeno prostático específico (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, prosteína, PSMA, Her2/neu, survivina y telomerasa, antígeno tumoral de carcinoma de próstata 1 (PCTA-1), MAGE, ELF2M, elastasa de neutrófilos, efrinB2, CD22, factor de crecimiento de insulina (IGF-I), IGF-II, Receptor de IGF-I y mesotelina.

En una realización, el antígeno tumoral comprende uno o más epítomos de cáncer antigénicos asociados con un tumor maligno. Los tumores malignos expresan una serie de proteínas que pueden servir como antígenos diana para un ataque inmunológico. Estas moléculas incluyen, pero no se limitan a, antígenos específicos de tejido, como MART-1, tirosinasa y GP 100 en melanoma y fosfatasa ácida prostática (PAP) y antígeno prostático específico (PSA) en cáncer de próstata. Otras moléculas diana pertenecen al grupo de moléculas relacionadas con la transformación, como el oncogén HER-2/Neu/ErbB-2. Otro grupo más de antígenos diana son antígenos onco-fetales, como el antígeno carcinoembrionario (CEA). En el linfoma de células B, el idiotipo de inmunoglobulina específico del tumor constituye un antígeno de inmunoglobulina específico del tumor que es exclusivo del tumor individual. Los antígenos de diferenciación de células B como CD19, CD20 y CD37 son otros candidatos para antígenos diana en linfomas de células B. Algunos de estos antígenos (CEA, HER-2, CD19, CD20, idiotipo) se han utilizado como dianas para la inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales con éxito limitado.

El tipo de antígeno tumoral mencionado en la invención también puede ser un antígeno específico de tumor (TSA) o un antígeno asociado a tumor (TAA). Una TSA es exclusivo de las células tumorales y no se presenta en otras células del cuerpo. Un antígeno asociado a TAA no es exclusivo de una célula tumoral y, en cambio, también se expresa en una célula normal en condiciones que no inducen un estado de tolerancia inmunológica al antígeno. La expresión del antígeno en el tumor puede ocurrir en condiciones que permitan al sistema inmunitario responder al antígeno. Los TAA pueden ser antígenos que se expresan en células normales durante el desarrollo fetal cuando el sistema inmunológico es inmaduro e incapaz de responder o pueden ser antígenos que normalmente están presentes en niveles extremadamente bajos en células normales pero que se expresan en niveles mucho más altos en células tumorales.

Los ejemplos no limitantes de antígenos TSA o TAA incluyen los siguientes: Antígenos de diferenciación tales como MART-1/MelanA (MART-I), gp100 (Pmel 17), tirosinasa, TRP-1, TRP-2 y antígenos multilinaje específicos de tumores tales como MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; antígenos embrionarios sobreexpresados como el CEA; oncogenes sobreexpresados y genes supresores de tumores mutados como p53, Ras, HER-2/neu; antígenos tumorales únicos resultantes de translocaciones cromosómicas; tales como BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; y antígenos virales, como los antígenos EBVA del virus de Epstein Barr y los antígenos E6 y E7 del virus del papiloma humano (VPH). Otros antígenos grandes basados en proteínas incluyen TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, Kras, beta-catenina, CDK4, Mum-1, p15, p16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, alfa-fetoproteína, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27.29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\P1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90\proteína de unión Mac-2\proteína asociada a ciclofilina C, TAAL6, TAG72, TLP y TPS .

En una realización preferida, la porción de la porción de unión a antígeno del CAR se dirige a un antígeno que incluye pero no se limita a CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, glicolípidos F77, EGFRVIII, GD-2, MY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR, y similares.

Dependiendo del antígeno deseado a localizar, el CAR de la invención puede diseñarse para incluir la porción de unión a antígeno apropiado que es específico para la diana de antígeno deseada. Por ejemplo, si CD19 es el antígeno deseado que se va a localizar, se puede usar un anticuerpo para CD 19 como la porción de unión a antígeno para su incorporación en el CAR de la invención.

En una realización, el vector de la invención comprende un ácido nucleico que codifica un CAR, en donde la porción de la porción de unión al antígeno del CAR de la invención se dirige al CD 19.

Dominio transmembrana

El dominio transmembrana del CAR se puede diseñar para comprender un dominio transmembrana que se fusiona con el dominio extracelular del CAR. En una realización, se usa el dominio transmembrana que naturalmente está asociado con uno de los dominios en el CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana puede seleccionarse o modificarse mediante la sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana de superficie para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

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

Preferiblemente, el dominio transmembrana en el CAR es el dominio transmembrana CD8. En algunos casos, el dominio transmembrana del CAR comprende el dominio de bisagra CD8 α .

Dominio citoplásmico

El dominio citoplásmico o, de lo contrario, el dominio de señalización intracelular del CAR es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la que se ha colocado el CAR. El término "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de una célula T, por ejemplo, puede ser la actividad citolítica o la actividad auxiliar, incluida la secreción de citocinas. Por lo tanto, el término "dominio de señalización intracelular" se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y dirige a la célula a realizar una función especializada. Si bien generalmente se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario usar toda la cadena. En la medida en que se use una porción truncada del dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada se puede usar en lugar de la cadena intacta siempre que transduzca la señal de la función efectora. El término dominio de señalización intracelular pretende incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función efectora.

Los ejemplos preferidos de dominios de señalización intracelular para uso en el CAR incluyen las secuencias citoplásmicas del receptor de células T (TCR) y los co-receptores que actúan en concierto para iniciar la transducción de señales después de la unión del receptor de antígeno, así como cualquier derivado o variante de

estas secuencias y cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional.

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

Las secuencias de señalización citoplásmicas primarias regulan la activación primaria del complejo TCR ya sea de forma estimuladora o de forma inhibitoria. Las secuencias de señalización citoplásmicas primarias que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación del inmunoreceptor basados en tirosina o ITAM.

Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplásmicas primarias que son de uso particular en la invención incluyen las derivadas de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. Se prefiere particularmente que la molécula de señalización citoplásmica en el CAR comprenda una secuencia de señalización citoplásmica derivada de CD3 zeta.

En una realización preferida, el dominio citoplásmico del CAR puede diseñarse para comprender el dominio de señalización CD3-zeta por sí mismo o combinado con cualquier otro dominio citoplásmico deseado útil en el contexto del CAR de la invención. Por ejemplo, el dominio citoplásmico del CAR puede comprender una porción de cadena zeta CD3 y una región de señalización coestimuladora. La región de señalización coestimuladora se refiere a una parte del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que se requiere para una respuesta eficiente de los linfocitos a un antígeno. Ejemplos de tales moléculas incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno-1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y un ligando que se une específicamente con CD83, y similares. Por lo tanto, aunque la invención se ejemplifica principalmente con 4-1BB como elemento de señalización coestimuladora, otros elementos coestimuladores están dentro del alcance de la invención.

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

En una realización, el dominio citoplásmico está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28. En otra realización, el dominio citoplásmico está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB. En otra realización más, el dominio citoplásmico está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28 y 4-1BB.

En una realización, el dominio citoplásmico en el CAR está diseñado para comprender el dominio de señalización de 4-1BB y el dominio de señalización de CD3-zeta.

Vectores

La presente descripción describe métodos para producir un vector que comprende secuencias de un CAR, en donde la secuencia comprende la secuencia de ácido nucleico de una porción de unión a antígeno unido de forma operativa a la secuencia de ácido nucleico de un dominio intracelular. Un dominio intracelular ejemplar que se puede usar en el CAR del vector incluye, entre otros, el dominio intracelular de CD3-zeta, CD28, 4-1BB, y similares. En algunos casos, el CAR puede comprender cualquier combinación de CD3-zeta, CD28, 4-1BB y similares.

En una realización, el CAR del vector comprende scFv anti-CD 19, dominio bisagra y transmembrana CD8 humano, y dominios de señalización humanos 4-1BB y CD3-zeta.

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

La presente descripción también describe vectores en los que se inserta un ADN. Los vectores derivados de retrovirus como el lentivirus son herramientas adecuadas para lograr la transferencia de genes a largo plazo, ya que permiten la integración estable y a largo plazo de un transgén y su propagación en células hijas. Los vectores lentivíricos tienen la ventaja añadida sobre los vectores derivados de onco-retrovirus, como los virus de la leucemia

murina, ya que pueden transducir células no proliferativas, como los hepatocitos. También tienen la ventaja añadida de baja inmunogenicidad.

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

Las construcciones de expresión de la presente invención también se pueden usar para la inmunización con ácido nucleico y la terapia génica, utilizando protocolos estándar de administración de genes. Los métodos para la administración de genes son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.399.346, 5.580.859, 5.589.466. En otra realización, la invención proporciona un vector de terapia génica.

El ácido nucleico puede clonarse en varios tipos de vectores. Por ejemplo, el ácido nucleico puede clonarse en un vector que incluye, entre otros, un plásmido, un fagémido, un derivado de fago, un virus animal y un cósmido. Los vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas y vectores de secuenciación.

Además, el vector de expresión puede proporcionarse a una célula en forma de un vector viral. La tecnología de vector viral es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York), y en otros manuales de virología y biología molecular. Los virus, que son útiles como vectores, incluyen, entre otros, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes 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 seleccionables (por ejemplo, WO 01/96584; WO 01/29058; y Patente de EE.UU. N° 6.326.193).

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

Los elementos promotores adicionales, por ejemplo, potenciadores, regulan la frecuencia de iniciación transcripcional. Normalmente, estos se encuentran en la región 30-110 pb corriente arriba del sitio de inicio, aunque recientemente se ha demostrado que varios promotores también contienen elementos funcionales corriente abajo del sitio de inicio. El espacio entre los elementos del promotor frecuentemente es flexible, de modo que la función del promotor se conserva cuando los elementos se invierten o se mueven entre sí. En el promotor de la timidina quinasa (tk), el espaciado entre los elementos del promotor puede incrementarse hasta 50 pb antes de que la actividad comience a disminuir. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar de forma cooperativa o independiente para activar la transcripción.

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

Para evaluar la expresión de un polipéptido CAR o porciones del mismo, el vector de expresión que se introducirá en una célula también puede contener un gen marcador seleccionable o un gen indicador o ambos para facilitar la identificación y selección de células que expresan de la población de células que se busca transfectar o infectar a través de vectores virales. En otros aspectos, el marcador seleccionable puede llevarse en una pieza separada de

ADN y usarse en un procedimiento de cotransfección. Tanto los marcadores seleccionables como los genes informadores pueden estar flanqueados con secuencias reguladoras apropiadas para permitir la expresión en las células huésped. Los marcadores seleccionables útiles incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos, tales como neo y similares.

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

Los métodos para introducir y expresar genes en una célula son conocidos en la técnica. En el contexto de un vector de expresión, el vector puede introducirse fácilmente en una célula huésped, por ejemplo, en células de mamíferos, bacterias, levaduras o insectos mediante cualquier método en la técnica. Por ejemplo, el vector de expresión puede transferirse a una célula huésped por medios físicos, químicos o biológicos.

Los métodos físicos para introducir un polinucleótido en una célula huésped incluyen precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación y similares. Los métodos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York). Un método preferido para la introducción de un polinucleótido en una célula huésped es la transfección con fosfato de calcio.

Los métodos biológicos para introducir un polinucleótido de interés en una célula huésped incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores virales, y especialmente los vectores retrovirales, se han convertido en el método más utilizado para insertar genes en células de mamíferos, por ejemplo, células humanas. Otros vectores virales pueden derivarse de lentivirus, poxvirus, virus del herpes simple I, adenovirus y virus adenoasociados, y similares. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.350.674 y 5.585.362.

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

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

Los lípidos adecuados para su uso pueden obtenerse de fuentes comerciales. Por ejemplo, la dimiristil fosfatidilcolina ("DMPC") puede obtenerse de Sigma, St. Louis, MO; el dicetil fosfato ("DCP") se puede obtener de K & K Laboratories (Plainview, NY); el colesterol ("Choi") se puede obtener de Calbiochem-Behring; el dimiristilfosfatidilglicerol ("DMPG") y otros lípidos se pueden obtener de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL). Las soluciones madre de lípidos en cloroformo o cloroformo/metanol se pueden almacenar a aproximadamente -20 ° C. El cloroformo se usa como el único disolvente, ya que se evapora más fácilmente que el metanol. "Liposoma" es un término genérico que abarca una variedad de vehículos de lípidos simples y multilamelares formados por la generación de bicapas o agregados de lípidos cerrados. Los liposomas se pueden caracterizar por tener estructuras

vesiculares con una membrana de bicapa de fosfolípido y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas lipídicas separadas por medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos experimentan auto-reordenamiento 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, las composiciones que tienen diferentes estructuras en solución que la estructura vesicular normal también están incluidas. Por ejemplo, los lípidos pueden asumir una estructura micelar o simplemente existir como agregados no uniformes de moléculas de lípidos. También se contemplan los complejos de lipofectamina-ácido nucleico.

Independientemente del método utilizado para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula huésped o de otra manera exponer una célula al inhibidor para confirmar la presencia de la secuencia de ADN recombinante en la célula huésped, se pueden realizar una variedad de ensayos. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos "biológicos moleculares" bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como transferencia Southern y Northern, RT-PCR y PCR; ensayos "bioquímicos", como la detección de la presencia o ausencia de un péptido particular, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA y transferencias de Western) o por ensayos descritos en el presente documento para identificar agentes que se encuentran dentro del alcance de la invención.

Fuentes de células T

Antes de la expansión y modificación genética de las células T de la invención, se obtiene una fuente de células T de un sujeto. Las células T pueden obtenerse de varias fuentes, incluidas las células mononucleares de sangre periférica, la médula ósea, el tejido de los ganglios linfáticos, la sangre del cordón umbilical, el tejido del timo, el tejido de un sitio de infección, la ascitis, el derrame pleural, el tejido del bazo y los tumores. En ciertas realizaciones de la presente invención, puede usarse cualquier número de líneas de células T disponibles en la técnica. En ciertas realizaciones de la presente invención, pueden obtenerse células T a partir de una unidad de sangre recogida de un sujeto usando cualquier número de técnicas conocidas por el experto en la técnica, tal como la separación con Ficoll™. En una realización preferida, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen por aféresis. El producto de la aféresis contiene típicamente linfocitos, incluidas las células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En una realización, las células recogidas por aféresis se pueden lavar para eliminar la fracción plasmática y colocar las células en un tampón o medio apropiado para los pasos de procesamiento posteriores. En una realización de la invención, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En una realización alternativa, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, si no todos, los cationes divalentes. De nuevo, sorprendentemente, los pasos iniciales de activación en ausencia de calcio conducen a una activación magnificada. Como los expertos en la materia apreciarán fácilmente, una etapa de lavado se puede lograr mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, como el uso de una centrifuga estándar, una centrifuga semiautomática de "flujo directo" (por ejemplo, el procesador celular Cobe 2991, el Baxter CytoMate o el Haemonetics Cell Saver 5) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del lavado, las células pueden resuspenderse en una variedad de tampones biocompatibles, como, por ejemplo, P2 libre de Ca²⁺, PBS libre de Mg²⁺, PlasmaLyte A, dextrosa al 5% en cloruro de sodio al 0,45%, u otra solución salina con o sin combinación de tampones. Alternativamente, los componentes indeseables de la muestra de aféresis se pueden eliminar y las células se resuspenden directamente en medios de cultivo.

En otra realización, las células T se aíslan de los linfocitos de sangre periférica lisando los glóbulos rojos y agotando los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente de PERCOLL™ o por elutriación centrífuga de contraflujo o Miltenyi Clini-MACS, o perlas magnéticas, o perlas magnéticas acopladas a anticuerpos. Una subpoblación específica de células T, tales como células T CD3⁺, CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺, CD45RO⁺, CD62L⁺, CD127⁺, puede aislarse o eliminarse mediante técnicas de selección positiva o negativa. Por ejemplo, en una realización, las células T se aíslan mediante incubación con perlas conjugadas con anti-CD3/anti-CD28 (es decir, 3x28), como DYNABEADS® M-450 T CD3/CD28, durante un período de tiempo suficiente para una selección positiva de las células T deseadas. En una realización, el período de tiempo es de aproximadamente 30 minutos. En una realización adicional, el período de tiempo varía de 30 minutos a 36 horas o más y todos los valores enteros entre ellos. En una realización adicional, el período de tiempo es de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. En otra realización preferida, el período de tiempo es de 10 a 24 horas. En una realización preferida, el período de incubación es de 24 horas. Para el aislamiento de células T de pacientes con leucemia, el uso de tiempos de incubación más prolongados, como 24 horas, puede aumentar el rendimiento celular. Se pueden usar tiempos de incubación más prolongados para aislar células T en cualquier situación en la que haya pocas células T en comparación con otros tipos de células, como aislar linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) de tejido tumoral o de individuos inmunocomprometidos. Además, el uso de tiempos de incubación más largos puede aumentar la eficacia de la captura de células T CD8⁺. Por lo tanto, simplemente acortando o alargando el tiempo en que se permite que las células T se unan a las perlas de CD3/CD28 y/o aumentando o disminuyendo la proporción de perlas a células T (como se describe más adelante en este documento), las subpoblaciones de células T pueden seleccionarse preferentemente a favor o en contra en el inicio del cultivo o en otros puntos de tiempo durante el proceso. Además, al aumentar o disminuir la proporción de anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 en las perlas u otra superficie, las subpoblaciones de células T pueden seleccionarse preferentemente a favor o en contra en el inicio del cultivo o en otros puntos de tiempo deseados. El experto en la materia reconocería que múltiples rondas de selección también

pueden usarse en el contexto de esta invención. En ciertas realizaciones, puede ser deseable realizar el procedimiento de selección y usar las células "no seleccionadas" en el proceso de activación y expansión. Las células "no seleccionadas" también pueden someterse a rondas adicionales de selección.

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

15 Para el aislamiento de una población deseada de células mediante selección positiva o negativa, la concentración de células y superficie puede variar (por ejemplo, partículas tales como perlas). En ciertas realizaciones, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan las perlas y las células (es decir, aumenta la concentración de las células), para asegurar el contacto máximo de las células y las perlas. Por ejemplo, en una realización, se utiliza una concentración de 2 billones de células/ml. En una realización, se usa una concentración de un billón de células/ml. En una realización adicional, se utilizan más de 100 millones de células/ml. En una realización adicional, se utiliza una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 millones de células/ml. En otra realización más, se usa una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En realizaciones adicionales, se pueden usar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede resultar en un aumento del rendimiento celular, activación celular y expansión celular. Además, el uso de altas concentraciones celulares permite la captura más eficiente de células que pueden expresar débilmente antígenos diana de interés, como las células T CD28 negativas, o de muestras donde hay muchas células tumorales presentes (es decir, sangre leucémica, tejido tumoral, etc.). Dichas poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable obtenerlas. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficiente de las células T CD8⁺ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

En una realización relacionada, puede ser deseable usar concentraciones más bajas de células. Al diluir significativamente la mezcla de células T y la superficie (por ejemplo, partículas como las perlas), se minimizan las interacciones entre las partículas y las células. Esto selecciona células que expresan altas cantidades de antígenos deseados para unirse a las partículas. Por ejemplo, las células T CD4⁺ expresan niveles más altos de CD28 y se capturan más eficientemente que las células T CD8⁺ en concentraciones diluidas. En una realización, la concentración de células utilizadas es 5 x10⁶/ml. En otras realizaciones, la concentración utilizada puede ser de aproximadamente 1 X 10⁵/ml a 1 X 10⁶/ml, y cualquier valor entero entre ellas.

40 En otras realizaciones, las células pueden incubarse en un rotador durante períodos de tiempo variables a velocidades variables de 2 a 37 °C.

Las células T para la estimulación también pueden congelarse después de una etapa de lavado. Deseando no quedar limitados por la teoría, el paso de congelación y descongelación posterior proporciona un producto más uniforme al eliminar los granulocitos y, en cierta medida, los monocitos en la población celular. Después de la etapa de lavado que elimina el plasma y las plaquetas, las células pueden suspenderse en una solución de congelación. Si bien muchas soluciones y parámetros de congelación son conocidos en la técnica y serán útiles en este contexto, un método implica el uso de PBS que contenga 20% de DMSO y 8% de albúmina de suero humano, o medios de cultivo que contengan 10% de dextrano 40 y 5% de dextrosa, 20% de albúmina sérica humana y 7,5% DMSO, o 31,25% de Plasmalyte-A, 31,25% de dextrosa al 5%, 0,45% de Na-Cl, 10% de dextrano 40 y 5% de dextrosa, 20% de albúmina sérica humana y 7,5% de DMSO u otro medio de congelación adecuado para células que contenga, por ejemplo, Hespan o pentalmidón, y PlasmaLyte A, las células se congelan entonces a -80 °C a una velocidad de 1 ° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Se pueden usar otros métodos de congelación controlada, así como la congelación no controlada inmediatamente a -20 °C o en nitrógeno líquido.

En ciertas realizaciones, las células crioconservadas se descongelan y se lavan como se describe en este documento y se dejan reposar durante una hora a temperatura ambiente antes de la activación utilizando los métodos de la presente invención.

60 También se contempla en el contexto de la invención la recolección de muestras de sangre o producto de aféresis de un sujeto en un período de tiempo anterior a cuando las células expandidas como se describen en el presente documento podrían ser necesarias. Como tal, la fuente de las células a expandir se puede recolectar en cualquier momento que sea necesario, y las células deseadas, como las células T, se pueden aislar y congelar para su uso posterior en la terapia con células T para cualquier número de enfermedades o afecciones que se beneficiarían de terapia de células T, como las descritas en este documento. En una realización, se toma una muestra de sangre o

una aféresis de un sujeto generalmente sano. En ciertas realizaciones, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente sano que está en riesgo de desarrollar una enfermedad, pero que aún no ha desarrollado la enfermedad, y las células de interés se aíslan y se congelan para su uso posterior. En ciertas realizaciones, las células T pueden expandirse, congelarse y usarse en un momento posterior. En ciertas realizaciones, las muestras se recogen de un paciente poco después del diagnóstico de una enfermedad particular como se describe en este documento pero antes de cualquier tratamiento. En una realización adicional, las células se aíslan de una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto antes de cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, que incluyen, entre otras, el tratamiento con agentes como natalizumab, efalizumab, agentes antivíricos, quimioterapia, radiación, inmunosupresores, agentes, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoablativos como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3, citoxano, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228 y radiación. Estos fármacos inhiben la calcineurina fosfatasa dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la quinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina) (Liu et al., Cell 66: 807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73: 316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5: 763-773, 1993). En una realización adicional, las células se aíslan para un paciente y se congelan para su uso posterior junto con (p. ej., antes, al mismo tiempo o después) del trasplante de médula ósea o de células madre, la terapia de ablación de células T con agentes de quimioterapia como fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos como OKT3 o CAMPATH. En otra realización, las células se aíslan antes y pueden congelarse para su uso posterior para el tratamiento después de la terapia ablativa con células B, como los agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan.

En una realización adicional de la presente invención, las células T se obtienen de un paciente directamente después del tratamiento. En este sentido, se ha observado que después de ciertos tratamientos contra el cáncer, en particular los tratamientos con medicamentos que dañan el sistema inmunológico, poco después del tratamiento durante el período en que los pacientes normalmente se estarían recuperando del tratamiento, la calidad de las células T obtenidas puede ser óptima, o mejorado por su capacidad para expandirse ex vivo. Del mismo modo, después de la manipulación ex vivo utilizando los métodos descritos en el presente documento, estas células pueden estar en un estado preferido para el injerto mejorado y la expansión in vivo. Por lo tanto, se contempla en el contexto de la presente invención recoger células sanguíneas, incluidas células T, células dendríticas u otras células del linaje hematopoyético, durante esta fase de recuperación. Además, en ciertas realizaciones, la movilización (por ejemplo, la movilización con GM-CSF) y los regímenes de acondicionamiento se pueden usar para crear una condición en un sujeto en el que se favorece la repoblación, recirculación, regeneración y/o expansión de tipos celulares particulares, especialmente durante una ventana de tiempo definida después de la terapia. Los tipos de células ilustrativos incluyen células T, células B, células dendríticas y otras células del sistema inmunológico.

Activación y expansión de las células T

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

En general, las células T de la invención se expanden por contacto con una superficie que tiene unida a él un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de las células T. En particular, las poblaciones de células T pueden estimularse como se describe en el presente documento, por ejemplo, por contacto con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o por contacto con un activador de la proteína quinasa C (por ejemplo, briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la coestimulación de una molécula accesoria en la superficie de las células T, se utiliza un ligando que se une a la molécula accesoria. Por ejemplo, una población de células T puede ponerse en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en condiciones apropiadas para estimular la proliferación de las células T. Para estimular la proliferación de células T CD4⁺ o células T CD8⁺, un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Los ejemplos de un anticuerpo anti-CD28 incluyen 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diaclone, Besançon, Francia) pueden usarse como otros métodos comúnmente conocidos en la técnica (Berg et al., Transplant Proc. 30 (8): 3975-3977, 1998; Haanen y otros, J. Exp. Med. 190 (9): 13191328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227 (1-2): 53-63, 1999).

En ciertas realizaciones, la señal de estimulación primaria y la señal de coestimulación para la célula T pueden proporcionarse mediante diferentes protocolos. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada señal pueden estar en solución o acoplados a una superficie. Cuando se acoplan a una superficie, los agentes pueden acoplarse a la misma superficie (es decir, en formación "cis") o a superficies separadas (es decir, en formación "trans"). Alternativamente, un agente puede estar acoplado a una superficie y el otro agente en solución. En una realización, el agente que proporciona la señal coestimuladora está unido a una superficie celular y el agente que proporciona la señal de activación primaria está en solución o acoplado a una superficie. En ciertas realizaciones, ambos agentes pueden estar en solución. En otra realización, los agentes pueden estar en forma soluble, y luego reticularse a una superficie, tal como una célula que expresa receptores Fc o un anticuerpo u otro agente de unión que se unirá a los

agentes. A este respecto, véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente de EE. UU. Números 20040101519 y 20060034810 para células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) que se contemplan para uso en la activación y expansión de células T en la presente invención.

5 En una realización, los dos agentes se inmovilizan en perlas, ya sea en la misma perla, es decir, "cis", o en perlas separadas, es decir, "trans". A modo de ejemplo, el agente que proporciona la señal de activación primaria es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y el agente que proporciona la señal coestimuladora es un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y ambos agentes se co-
 10 inmovilizan en la misma cuenta en cantidades moleculares equivalentes. En una realización, se usa una proporción 1:1 de cada anticuerpo unido a las perlas para la expansión de células T CD4⁺ y el crecimiento de células T. En ciertos aspectos de la presente invención, se usa una proporción de anticuerpos anti CD3:CD28 unidos a las perlas, de manera que se observa un aumento en la expansión de células T en comparación con la expansión observada usando una proporción de 1:1. En una realización particular, se observa un aumento de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 veces en comparación con la expansión observada usando una relación de 1:1. En una
 15 realización, la proporción de anticuerpo CD3:CD28 unido a las perlas varía de 100:1 a 1:100 y todos los valores enteros entre ellos. En un aspecto de la presente invención, más anticuerpo anti-CD28 está unido a las partículas que el anticuerpo anti-CD3, es decir, la proporción de CD3:CD28 es menor que uno. En ciertas realizaciones de la invención, la proporción de anticuerpo anti CD28 respecto al anticuerpo anti CD3 unido a las perlas es mayor que 2:1. En una realización particular, se usa una relación 1:100 CD3:CD28 de anticuerpo unido a perlas. En otra
 20 realización, se usa una relación 1:75 CD3:CD28 de anticuerpo unido a perlas. En una realización adicional, se usa una relación 1:50 CD3:CD28 de anticuerpo unido a perlas. En otra realización, se usa una relación 1:10 CD3: CD28 de anticuerpo unido a perlas. En otra realización, se usa una relación 1:3 CD3:CD28 de anticuerpo unido a las perlas. En otra realización más, se usa una relación 3:1 CD3: CD28 de anticuerpo unido a las perlas.

25 Se pueden usar las relaciones de partículas respecto a células de 1: 500 a 500:1 y cualquier valor entero entre ellas para estimular las células T u otras células diana. Como los expertos en la técnica pueden apreciar fácilmente, la proporción de partículas respecto a células puede depender del tamaño de partícula con respecto a la célula diana. Por ejemplo, las perlas de tamaño pequeño solo podrían unir unas pocas células, mientras que las perlas más
 30 grandes podrían unirse a muchas. En ciertas realizaciones, la proporción de células respecto a partículas varía entre 1:100 y 100:1 y cualquier valor entero entre ellas y en otras realizaciones, la relación comprende entre 1:9 a 9:1 y cualquier valor entero entre ellas también se puede usar para estimular las células T. La proporción de partículas acopladas con anti-CD3 y anti-CD28 a células T que dan como resultado la estimulación de células T puede variar como se indicó anteriormente, sin embargo, ciertos valores preferidos incluyen 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10,
 35 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 y 15:1, con una relación preferida de al menos 1:1 partículas por célula T. En una realización, se usa una relación de partículas respecto a células de 1:1 o menos. En una realización particular, una proporción de partículas:célula preferida es 1:5. En realizaciones adicionales, la proporción de partículas respecto a células puede variar dependiendo del día de la estimulación. Por ejemplo, en una realización, la proporción de partículas respecto a células es de 1:1 a 10:1 en el primer día y las
 40 partículas adicionales se agregan a las células cada día o cada dos días a partir de entonces hasta 10 días, en las relaciones finales de 1:1 a 1:10 (según los recuentos de células en el día de la adición). En una realización particular, la proporción de partículas respecto a células es 1:1 en el primer día de estimulación y se ajusta a 1:5 en el tercer y quinto día de estimulación. En otra realización, las partículas se agregan diariamente o cada dos días a una proporción final de 1:1 en el primer día, y de 1:5 en el tercer y quinto día de estimulación. En otra realización, la
 45 proporción de partículas respecto a células es de 2:1 en el primer día de estimulación y se ajusta a 1:10 en el tercer y quinto día de estimulación. En otra realización, las partículas se agregan diariamente o cada dos días a una relación final de 1:1 en el primer día, y 1:10 en el tercer y quinto día de estimulación. Un experto en la materia apreciará que una variedad de otras relaciones pueden ser adecuadas para su uso en la presente invención. En particular, las proporciones variarán dependiendo del tamaño de partícula y del tamaño y tipo de celda.

50 En otras realizaciones de la presente invención, las células, tales como las células T, se combinan con perlas recubiertas con agente, las perlas y las células se separan posteriormente, y luego las células se cultivan. En una realización alternativa, antes del cultivo, las perlas y las células recubiertas con agente no se separan sino que se cultivan juntas. En una realización adicional, las perlas y las células se concentran primero mediante la aplicación de
 55 una fuerza, tal como una fuerza magnética, que resulta en un aumento de la ligadura de los marcadores de la superficie celular, induciendo así la estimulación celular.

A modo de ejemplo, las proteínas de la superficie celular pueden ligarse permitiendo que las perlas paramagnéticas a las que se unen anti-CD3 y anti-CD28 (perlas 3x28) entren en contacto con las células T. En una realización, las
 60 células (por ejemplo, 10⁴ a 10⁹ células T) y las perlas (por ejemplo, las perlas paramagnéticas DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 a una proporción de 1:1) se combinan en un tampón, preferiblemente PBS (sin cationes divalentes como calcio y magnesio). De nuevo, los expertos en la técnica pueden apreciar fácilmente que se puede usar cualquier concentración celular. Por ejemplo, la célula diana puede ser muy rara en la muestra y comprender solo el 0,01% de la muestra o la célula diana de interés puede comprender la muestra completa (es decir, el 100%). Por consiguiente,
 65 cualquier número de células está dentro del contexto de la presente invención. En ciertas realizaciones, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que las partículas y las células se mezclan entre sí (es decir,

5 aumentar la concentración de las células), para garantizar el máximo contacto de las células y las partículas. Por ejemplo, en una realización, se utiliza una concentración de aproximadamente 2 billones de células/ml. En otra realización, se utilizan más de 100 millones de células/ml. En una realización adicional, se usa una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. En otra realización más, se usa una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En realizaciones adicionales, se pueden usar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede resultar en un aumento del rendimiento celular, activación celular y expansión celular. Además, el uso de altas concentraciones celulares permite una captura más eficiente de las células que pueden expresar débilmente antígenos diana de interés, como las células T CD28 negativas. Dichas poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable obtenerlas en ciertas realizaciones. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficiente de las células T CD8⁺ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

15 En una realización de la presente invención, la mezcla puede cultivarse durante varias horas (aproximadamente 3 horas) hasta aproximadamente 14 días o cualquier valor entero por hora entre ellas. En otra realización, la mezcla se puede cultivar durante 21 días. En una realización de la invención, las perlas y las células T se cultivan juntas durante aproximadamente ocho días. En otra realización, las perlas y las células T se cultivan juntas durante 2-3 días. También se pueden desear varios ciclos de estimulación, de modo que el tiempo de cultivo de las células T pueda ser de 60 días o más. Las condiciones apropiadas para el cultivo de células T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, medio esencial mínimo o medio RPMI 1640 o, medio X-vivo 15, (Lonza)) que pueden contener los factores necesarios para la proliferación y viabilidad, incluido el suero (por ejemplo, suero bovino fetal o humano), interleuquina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, IL-7, GMCSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β y TNF-a o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocidas por el experto en la materia. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, pero no se limitan a, tensioactivo, plasmanato y agentes reductores tales como N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, ya sea sin suero o suplementado con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citoquina(s) suficiente para el crecimiento y expansión de las células T. Los antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomina, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se deben infundir en un sujeto. Las células diana se mantienen bajo las condiciones necesarias para soportar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura apropiada (por ejemplo, 37 °C) y la atmósfera (por ejemplo, aire más 5% de CO₂).

35 Las células T que han sido expuestas a tiempos de estimulación variados pueden exhibir características diferentes. Por ejemplo, los productos típicos de sangre o de células periféricas mononucleares de sangre periférica tienen una población de células T auxiliares (T_H, CD4⁺) que es mayor que la población de células T citotóxicas o supresoras (T_C, CD8⁺). La expansión ex vivo de las células T mediante la estimulación de los receptores CD3 y CD28 produce una población de células T que antes de aproximadamente los días 8-9 consiste predominantemente en células T_H, mientras que después de aproximadamente los días 8-9, la población de células T comprende una población cada vez mayor de células T_C. Por consiguiente, dependiendo del propósito del tratamiento, puede ser ventajoso infundir a un sujeto con una población de células T que comprende predominantemente de células T_H. De manera similar, si se ha aislado un subconjunto específico de antígeno de células T_C, puede ser beneficioso expandir este subconjunto en mayor grado.

45 Adicionalmente, además de los marcadores CD4 y CD8, otros marcadores fenotípicos varían significativamente, pero en gran parte, son reproducibles durante el curso del proceso de expansión celular. Por lo tanto, dicha reproducibilidad permite la capacidad de adaptar un producto de células T activadas para fines específicos.

Aplicación terapéutica

50 La presente invención abarca una célula (por ejemplo, una célula T) transducida con un vector (por ejemplo, un vector lentiviral (LV)). Por ejemplo, el LV codifica un CAR que combina un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico con un dominio intracelular de CD3-zeta, CD28, 4-1BB, o cualquiera de sus combinaciones. Por lo tanto, en algunos casos, las células T transducidas pueden provocar una respuesta de células T mediada por CAR.

55 La invención proporciona el uso de un CAR para redirigir la especificidad de una célula T primaria a un antígeno tumoral. Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para estimular una respuesta inmune mediada por células T a una población o tejido de células diana en un mamífero que comprende la etapa de administrar al mamífero una célula T que expresa un CAR, en la que el CAR comprende una porción de unión que interactúa específicamente con un objetivo predeterminado, una parte de la cadena zeta que comprende, por ejemplo, el dominio intracelular de CD3-zeta humano y una región de señalización coestimuladora.

65 En una realización, la presente invención incluye un tipo de terapia celular en la que las células T se modifican genéticamente para expresar un CAR y la célula T CAR se infunde a un receptor que la necesita. La célula infundida es capaz de matar células tumorales en el receptor. A diferencia de las terapias con anticuerpos, las células T CAR pueden replicarse in vivo, lo que resulta en una persistencia a largo plazo que puede conducir a un control sostenido del tumor.

En una realización, las células T CAR de la invención pueden experimentar una expansión robusta de células T in vivo y pueden persistir durante un período prolongado de tiempo. En otra realización, las células T CAR de la invención evolucionan hacia células T de memoria específicas que pueden reactivarse para inhibir cualquier formación o crecimiento de tumores adicionales. Por ejemplo, fue inesperado que las células CART 19 de la invención pudieran experimentar una expansión robusta de células T in vivo y persistir en niveles altos durante un período prolongado en la sangre y la médula ósea y formar células T de memoria específica. Sin desear estar ligado a ninguna teoría particular, las células T CAR pueden diferenciarse in vivo en un estado similar a la memoria central tras el encuentro y la posterior eliminación de las células diana que expresan el antígeno sustituto.

Sin desear estar ligado a ninguna teoría particular, la respuesta inmunitaria antitumoral provocada por las células T CAR modificadas puede ser una respuesta inmune activa o pasiva. Además, la respuesta inmunitaria mediada por CAR puede ser parte de un enfoque de inmunoterapia adoptiva en el que las células T modificadas por CAR inducen una respuesta inmunitaria específica para la porción de unión al antígeno en el CAR. Por ejemplo, una célula CART19 provoca una respuesta inmunitaria específica contra las células que expresan CD19.

Si bien los datos descritos en el presente documento describen específicamente un vector lentiviral que comprende scFv anti-CD19 derivado del anticuerpo monoclonal murino FMC63, dominio de transmembrana y bisagra de CD8 α humano, y dominios de señalización de 4-1BB y CD3-zeta humanos, la invención debe interpretarse para incluir cualquier número de variaciones para cada uno de los componentes de la construcción como se describe en otra parte del presente documento. Es decir, la invención incluye el uso de cualquier porción de unión a antígeno en el CAR para generar una respuesta de células T mediada por CAR específica para la porción de unión a antígeno. Por ejemplo, la porción de unión a antígeno en el CAR de la invención puede dirigirse a un antígeno tumoral con el fin de tratar el cáncer.

Los cánceres que pueden tratarse incluyen tumores que no están vascularizados, o que todavía no están sustancialmente vascularizados, así como tumores vascularizados. Los cánceres pueden comprender tumores no sólidos (como tumores hematológicos, por ejemplo, leucemias y linfomas) o pueden comprender tumores sólidos. Los tipos de cánceres que se tratarán con los CAR de la invención incluyen, entre otros, carcinoma, blastoma y sarcoma, y ciertas leucemias o neoplasias linfoides, tumores benignos y malignos y, por ejemplo, sarcomas, carcinomas y melanomas. También se incluyen tumores/cánceres adultos y tumores/cánceres pediátricos.

Los cánceres hematológicos son cánceres de la sangre o de la médula ósea. Entre los ejemplos de cánceres hematológicos (o hematógenos) se incluyen las leucemias, incluidas las leucemias agudas (como la leucemia linfocítica aguda, la leucemia mielocítica aguda, la leucemia mielógena aguda y la mieloblástica, promielocítica, leucemia, promielocítica, mielomocítica, monocelítica y eritrolítica), leucemias crónicas, (como la leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (formas indolentes y de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de la cadena pesada, síndrome mielodisplásico, leucemia de células peludas y mielodisplasia.

Los tumores sólidos son masas anormales de tejido que usualmente no contienen quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos. Los diferentes tipos de tumores sólidos reciben su nombre por el tipo de células que los forman (como sarcomas, carcinomas y linfomas). Los ejemplos de tumores sólidos, como los sarcomas y los carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, osteosarcoma y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer linfóide, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cánceres de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma tiroideo medular, carcinoma tiroideo papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hematoma, carcinoma de conducto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilm, cáncer cervical, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga, melanoma y tumores del SNC (como un glioma (como el glioma del tronco encefálico y los gliomas mixtos), glioblastoma (también conocido como glioblastoma multiforme), astrocitoma, linfoma del SNC, germinoma, meduloblastoma, Schwannoma, craneofariangioma, ependioma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, neuroblastoma, retinoblastoma y metástasis cerebrales).

En una realización, la porción de la porción de unión a antígeno del CAR de la invención está diseñada para tratar un cáncer particular. Por ejemplo, el CAR diseñado para reconocer CD 19 se puede usar para tratar cánceres y trastornos que incluyen, entre otros, una LLA pre-B (indicación pediátrica), LLA en adultos, linfoma de células del manto, linfoma difuso de células B grandes, rescate post-alogénico de trasplante de médula ósea, y similares.

En otra realización, el CAR puede diseñarse para reconocer CD22 para tratar el linfoma difuso de células B grandes.

En una realización, pueden tratarse cánceres y los trastornos incluyen, entre otros, la LLA pre-B (indicación pediátrica), LLA en adultos, linfoma de células del manto, linfoma de células B grandes difusas, rescate post-alogénico de trasplante de médula ósea y similares utilizando una combinación de CAR que reconocen CD19,

CD20, CD22 y ROR1.

En una realización, el CAR puede diseñarse para reconocer la mesotelina para tratar el mesotelioma, el cáncer de páncreas, el cáncer de ovario y similares.

En una realización, el CAR puede diseñarse para reconocer CD33/IL3Ra para tratar la leucemia mielógena aguda y similares.

En una realización, el CAR puede diseñarse para reconocer c-Met para tratar el cáncer de mama triple negativo, el cáncer de pulmón de células no pequeñas, y similares.

En una realización, el CAR puede diseñarse para reconocer PSMA para tratar el cáncer de próstata y similares.

En una realización, el CAR puede diseñarse para reconocer glicolípido F77 para tratar el cáncer de próstata y similares.

En una realización, el CAR puede diseñarse para reconocer EGFRvIII para tratar el glioblastoma y similares.

En una realización, el CAR puede diseñarse para reconocer GD-2 para tratar neuroblastoma, melanoma y similares.

En una realización, el CAR puede diseñarse para reconocer NY-ESO-1 TCR para tratar mieloma, sarcoma, melanoma y similares.

En una realización, el CAR puede diseñarse para reconocer MAGE A3 TCR para tratar mieloma, sarcoma, melanoma y similares.

Sin embargo, la invención no debe considerarse limitada únicamente a las dianas antigénicas y enfermedades descritas en el presente documento. Más bien, debe interpretarse que la invención incluye cualquier diana antigénica que esté asociada con una enfermedad en la que se pueda usar un CAR para tratar la enfermedad.

Las células T CAR modificadas de la invención también pueden servir como un tipo de vacuna para inmunización ex vivo y/o terapia in vivo en un mamífero. Preferiblemente, el mamífero es un humano.

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

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

El procedimiento para la expansión ex vivo de células madre y progenitoras hematopoyéticas se describe en la patente de EE.UU. 5.199.942, incorporada aquí como referencia, puede aplicarse a las células de la presente invención. Otros métodos adecuados son conocidos en la técnica, por lo tanto, la presente invención no se limita a ningún método particular de expansión ex vivo de las células. Brevemente, el cultivo y expansión de células T ex vivo comprende: (1) la recolección de células progenitoras y hematopoyéticas CD34⁺ de un mamífero de una muestra de sangre periférica o explantes de médula ósea; y (2) expandir dichas células ex vivo. Además de los factores de crecimiento celular descritos en las patentes de EE.UU. N^o 5.199.942, otros factores tales como flt3-L, IL-1, IL-3 y ligando ckit, se pueden usar para el cultivo y la expansión de las células.

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

En general, las células activadas y expandidas como se describe en el presente documento se pueden utilizar en el tratamiento y la prevención de enfermedades que surgen en individuos que están inmunocomprometidos. En particular, las células T CAR modificadas de la invención se usan en el tratamiento de la LLC. En ciertas realizaciones, las células de la invención se usan en el tratamiento de pacientes con riesgo de desarrollar LLC. Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos para el tratamiento o la prevención de la LLC que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente efectiva de las células T CAR modificadas de la invención.

Las células T CAR modificadas de la presente invención pueden administrarse solas o como una composición

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

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

Cuando se indica "una cantidad inmunológicamente efectiva", "una cantidad antitumoral efectiva", "una cantidad inhibidora de tumores efectiva" o "cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones de la presente invención puede determinarse por un médico considerando las diferencias individuales en edad, peso, tamaño del tumor, grado de infección o metástasis y condición del paciente (sujeto). En general, puede afirmarse que una composición farmacéutica que comprende las células T descritas en este documento puede administrarse en una dosis de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, preferiblemente de 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, incluidos todos los valores enteros dentro de esos rangos. Las composiciones de células T también pueden administrarse múltiples veces en estas dosificaciones. Las células se pueden administrar mediante el uso de técnicas de infusión que se conocen comúnmente en inmunoterapia (ver, por ejemplo, Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319: 1676, 1988). El experto en la técnica de la medicina puede determinar fácilmente la dosis óptima y el régimen de tratamiento para un paciente en particular al monitorizar al paciente para detectar signos de enfermedad y ajustar el tratamiento en consecuencia.

En ciertas realizaciones, puede desearse administrar células T activadas a un sujeto y luego reintroducir la sangre (o realizar una aféresis), activar las células T de la misma de acuerdo con la presente invención, y reinfundir al paciente con estas células T expandidas. Este proceso puede llevarse a cabo varias veces cada pocas semanas. En ciertas realizaciones, las células T pueden activarse 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 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc o 100cc. Para no limitarse a la teoría, el uso de este protocolo de extracción de sangre múltiple/reinfusión múltiple puede servir para seleccionar ciertas poblaciones de células T.

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

En ciertas realizaciones de la presente invención, las células activadas y expandidas usando los métodos descritos en este documento, u otros métodos conocidos en la técnica donde las células T se expanden a niveles terapéuticos, se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o siguiendo) cualquier número de modalidades de tratamiento relevante, que incluyen, entre otras, el tratamiento con agentes como la terapia antiviral, cidofovir e interleuquina-2, la citarabina (también conocida como ARA-C) o el tratamiento con natalizumab para pacientes con EM o el tratamiento con efalizumab para pacientes con psoriasis u otros tratamientos para pacientes con LMP. En otras realizaciones, las células T de la invención se pueden usar en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoblivos como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3, u otras terapias de anticuerpos, citoxina, fludaribina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citoquinas y radiación. Estos fármacos inhiben la calcineurina fosfatasa dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la quinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina) (Liu et al., *Cell* 66: 807-815, 1991; Henderson et al., *Immun.* 73: 316-321, 1991; Bierer et al., *Curr. Opin. Immun.* 5: 763-773, 1993). En una realización adicional, las composiciones celulares de la presente invención se administran a un paciente junto con (p. ej., antes, simultáneamente o después) del trasplante de médula ósea, la terapia ablativa con células T utilizando agentes de quimioterapia como la fludarabina, terapia de radiación de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos como OKT3 o CAMPATH. En otra realización, las composiciones celulares de la presente invención se administran después de una terapia ablativa de células B, tales como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, en una realización, los sujetos pueden someterse a un tratamiento estándar con altas dosis de quimioterapia seguida de trasplante de células madre de sangre periférica. En ciertas realizaciones, después del trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células

inmunes expandidas de la presente invención. En una realización adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

5 La dosis de los tratamientos anteriores que se administrarán a un paciente variará con la naturaleza precisa de la afección que se está tratando y el receptor del tratamiento. La escala de las dosis para administración humana se puede realizar de acuerdo con las prácticas aceptadas en la técnica. La dosis para CAMPATH, por ejemplo, generalmente estará en el rango de 1 a aproximadamente 100 mg para un paciente adulto, generalmente administrada diariamente durante un período de entre 1 y 30 días. La dosis diaria preferida es de 1 a 10 mg por día, aunque en algunos casos se pueden usar dosis mayores de hasta 40 mg por día (descritas en la Patente de Estados Unidos No. 6.120.766).

Ejemplos experimentales

15 La invención se describe adicionalmente en detalle mediante referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos y no pretenden ser limitativos a menos que se especifique lo contrario. Por lo tanto, la invención no debe interpretarse de ninguna manera como limitada a los siguientes ejemplos, sino que debe interpretarse para abarcar cualquiera y todas las variaciones que se vuelven evidentes como resultado de la enseñanza proporcionada en este documento.

20 Sin una descripción adicional, se cree que un experto en la técnica puede, usando la descripción precedente y los siguientes ejemplos ilustrativos, preparar y utilizar los compuestos de la presente invención y practicar los métodos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo, por lo tanto, señalan específicamente las realizaciones preferidas de la presente invención, y no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera el resto de la descripción.

25 Ejemplo 1: Análisis de contaminantes.

Los linfocitos transducidos para expresar receptores de antígenos quiméricos (CAR) destinados a la administración en un sujeto humano se analizan para detectar y cuantificar posibles contaminantes introducidos durante el proceso de transducción.

30 Declaración general del laboratorio

Los procesos de investigación de muestras, congelación y análisis de laboratorio se realizaron de acuerdo con los principios de Buenas Prácticas de Manufactura o Buenas Prácticas de Laboratorio con PNT y/o protocolos establecidos para la recepción, el procesamiento, la congelación y el análisis de muestras.

Producción de vectores

40 El transgén CD19-BB-z (GeMCRIS 0607-793) se diseñó y construyó como se describe (Milone et al., 2009, Mol Ther. 17: 1453-1464). El vector lentiviral se produjo de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación actuales utilizando un enfoque de producción de tres plásmidos en Lentigen Corporation como se describe (Zufferey et al., 1997, Nature Biotechnol 15: 871-875). Se diseñó un vector lentiviral autoinactivador (GeMCRIS 0607-793), que se sometió a pruebas de seguridad preclínicas, como se describió anteriormente (Milone et al., 2009, Mol Ther, 17: 1453-64). Los métodos de preparación de células T también se han descrito anteriormente (Porter et al, 2006, Blood, 45 107: 1325-31).

Preparación de células T CART-19

50 Las células T autólogas están diseñadas para expresar un anticuerpo extracelular de cadena única (scFv) con especificidad para CD19. El scFv extracelular puede redirigir la especificidad de las células T transducidas para las células que expresan el CD 19, una molécula que tiene una expresión restringida en la superficie de las células malignas y en las células B normales. Además del CD 19 scFv, las células se transducen para expresar una molécula de señalización intracelular que comprende la cadena TCR ζ o un dominio de señalización en tándem que comprende los módulos de señalización 4-1BB y TCR ζ . El scFv deriva de un anticuerpo monoclonal de ratón y, por lo tanto, contiene secuencias de ratón, y los dominios de señalización son totalmente de las secuencias humanas nativas. Las células T CART-19 se fabrican aislando las células T mediante aféresis y utilizando tecnología de vector lentiviral (Dropulic et al., 2006, Human Gene Therapy, 17: 577-88; Naldini et al., 1996, Science, 272: 263 -7; Dull et al., 1998, J Virol, 72: 8463-71) para introducir el scFv:TCR ζ :4-1BB en células T CD4 y CD8. En algunos pacientes, se introduce un control scFv:TCR ζ : en una porción de las células para un experimento de repoblación competitivo. Estos receptores son "universales" porque se unen al antígeno de manera independiente del MHC, por lo tanto, se puede usar un constructo de receptor para tratar una población de pacientes con tumores positivos para el antígeno CD19.

65 Los constructos de CAR se desarrollaron en la Universidad de Pennsylvania, y el vector de calidad clínico se fabricó en Lentigen Corporation. Las células T CART-19 se fabrican en la instalación de producción de vacunas y células clínicas en la Universidad de Pennsylvania de acuerdo con el proceso que se muestra en la Figura 2. Al final de los

cultivos celulares, las células se crioconservan en criomedio infundible.

Viabilidad de células T

- 5 La viabilidad de las células T después de la transducción se determinó utilizando un ensayo de exclusión de azul de tripan (utilizando una tinción de azul de tripano de 0,4% (Gibco BRL n° de catálogo 15250-061 más medio o diluyente y un hemacitómetro de Bright-Line (Hausser Scientific Company)) o 7-AAD para determinar el porcentaje de células vivas (utilizando BD ViaProbe (n° de catálogo 555815, BD Biosciences Pharmingen) y citómetro de flujo.
- 10 **Carácter de células T**
El porcentaje de células transducidas que expresan o no expresan marcadores de células T particulares descritos en otra parte en el presente documento se determinó usando tinción celular y citometría de flujo.
- 15 **Eficiencia de transducción**
La eficacia de transducción de las células T se determinó usando citometría de flujo, PCR cuantitativa o tanto citometría de flujo como PCR cuantitativa.
- 20 **Presencia y cantidad de endotoxinas.**
La presencia de endotoxina en cultivos de células T transducidos se evaluó usando un ensayo de coágulo de gel.
- 25 3.1.1 Lector cinético PTS Endosafe
Charles River Laboratories,
3.1.2 Programa PTS Logger
3.1.3 Cartucho de inhibición/potenciación desechable Charles River/n° cat. PTS220
3.1.4 Cartuchos LAL desechables para ensayos (0,01-1,0/mL) y C de A para cada lote
30 Charles River/ n° cat. PTS2001F
3.1.5 Cartuchos LAL desechables para ensayos (0,005-0,5EU/mL) y C de A para cada lote Charles River/
n° cat. PTS20005F
Ensayo de punto final cromogénico - lectura en el espectrofotómetro
3.1.6 Reactivo de parada: 20% p/v ácido acético glacial n° cat. BP2401-212, Fisher Scientific, Pittsburgh,
35 PA Tel: 1-800-766-7000
3.1.7 Kit de ensayo de lisado de amebocitos de Limulus n° cat. 50-648U (300 pruebas) o 50-647U (120
pruebas), Cambrex 8830 Biggs Ford Road, Walkersville, MD 21793 Tel: 800-654-4452, ext. 7822, Fax: 301-
845-2924
3.1.7.1 Endotoxina de E. coli
3.1.7.2 Sustrato Cromogénico
3.1.7.3 Lisado de amebocitos de limulus cromogénico (LAL)
3.1.7.4 Agua del reactivo LAL (solo kit para 120 pruebas)
3.1.8 Agua del reactivo LAL n° cat. W50-640, Cambrex, 8830 Biggs Ford Road, Walkersville, MD 21793 Tel:
800-654-4452, Fax: 301-845-2924
40 Ensayo cinético cromogénico - lectura en el espectrofotómetro
3.1.9 Reactivo de parada: 20% p/v ácido acético glacial n° cat. BP2401-212, Fisher Scientific
3.1.10 lisado de amebocitos de limulus (LAL) Kit de ensayo de endotoxinas de QCL-QCL n° cat. 50-650U
(192 pruebas), Lonza/Cambrex
3.1.10.1 Endotoxina de E. coli
50 3.1.10.2 Reactivo de QCL cinético (una mezcla de LAL/sustrato cromogénico)
Agua del reactivo LAL
Ensayo de coágulo de gel
4.1.1 Lisado de amebocitos de limulus de Pruebas Múltiples, pruebas PYROGENT® Plus 200 Sensibilidad
0,125 EU/mL N° de Cat. N294-125, Lonza
55 4.1.1.1 Lisado de amebocitos de limulus (LAL) sensibilidad 0,125 EU/mL
4.1.1.1.1 4 viales para ensayo 50 x (5,2 mL/vial)
4.1.1.2 Endotoxina de E. coli O55:B5, 10 ng/vial, liofilizado, control estándar de endotoxina (CSE)
4.1.1.2.1 NOTA: La potencia de CSE en EU/mL se especifica en el Certificado de análisis. El COA ya no se
suministra con el kit.
60 4.1.1.2.2 Para acceder a un Certificado de análisis, vaya a <http://www.lonzabio.com/2506.html>, ingrese el
Número de catálogo y el Número de lote que se encuentran en la etiqueta del producto en la parte frontal de
la caja del kit.
4.1.2 Reactivo LAL, sensibilidad del lisado 0,125 EU/mL (Charles River Laboratories, n° de cat. R11012)
4.1.2.1 Paquete de 12
65 4.1.3 Control de endotoxinas estándar 10ng/vial (Charles River Laboratories, n° de cat. E120_
4.1.3.1 Paquete de 6

4.1.4 Agua del reactivo LAL (LRW), 30 ml/vial, n° Cat. W130, Charles River Laboratories

Presencia y cantidad de micoplasma

5 La presencia de micoplasma en cultivos de células T transducidos se evaluó utilizando un ensayo de mycoalert.

3.1.11 Kit de detección de micoplasma MycoAlert (Lonza, n.º de catálogo LT07-318) -100 pruebas

3.1.12 Control de análisis MycoAlert (Lonza N° de catálogo LT07-518)

3.1.13 microplacas de 96 pocillos, fondo blanco opaco (Corning Incorporated n° de catálogo 3912)

10 Corning Incorporated Life Sciences 45 Nagog Park, Acton MA 01720 Tel: 1-978-635 -2200, Fax: 1-978-635-2476

Lectura en el luminómetro.

MycoProbe Mycoplasma ELISA: <http://www.rndsystems.com/pdf/CUL001B.pdf>

15 Presencia y cantidad de lentivirus competente para replicación (RCL)

La presencia de RCL en cultivos de células T transducidos se evaluó utilizando un ensayo de PCR que evalúa VSV-G y gag de VIH, y ELISA para p24.

20 Presencia y cantidad de p24.

La presencia de p24 en cultivos de células T transducidos se evaluó utilizando un ensayo ELISA.

5.1.1 Kit ELISA PerkinElmer HIV-1 p24,

25 n° de cat. NEK050 (1x placa de 96 pocillos),

NEK050A (2x placa de 96 pocillos)

NEK050B (5x placa de 96 pocillos)

PerkinElmer, Inc, 940 Winter Street, Waltham, Massachusetts 02451, teléfono: 800-762-4000

30 Presencia y cantidad del ácido nucleico VSV-G

La presencia de ácido nucleico de VSV-G en cultivos de células T transducidos se evaluó usando un ensayo de PCR cuantitativo utilizando una combinación de cebador/sonda que amplifica y detecta específicamente las secuencias de VSV-G en condiciones estándar de amplificación ABI. Se realizó un ensayo de QPCR cualificado para cuantificar el ADN de VSV-G utilizando los cebadores anteriores. El ensayo cualificado utiliza una curva estándar generada a partir de ADN genómico aislado de PBMC enriquecido con el plásmido pC1-VSV-G que contiene la secuencia del gen VSV-G; la curva estándar varía de $1 \times 10^{6-10}$ copias de PBMC VSV-G/100 ng. Para cada producto final, la presencia de ADN de VSV-G residual se evalúa en reacciones por triplicado utilizando aproximadamente 200 ng de ADN genómico aislado del producto. La cantidad de plásmido VSV-G residual se determina a partir de las curvas estándar y se reporta como copias del plásmido de VSVG/microgramo del ADN genómico después de corregir y normalizar la cantidad de ADN de entrada. La presencia de ácido nucleico plasmídico contaminante para cada uno de los plásmidos de empaquetamiento adicionales (LIST) se puede determinar de esta manera utilizando combinaciones de cebador/sonda específicas para cada plásmido utilizado en la etapa de empaquetado (VSVG, Gag pol, P24, pRSV.rev).

45 Presencia y cuantificación de bacterias.

La presencia de bacterias en cultivos de células T transducidos se evaluó intentando cultivar bacterias usando material de los cultivos de células T transducidos. El ensayo BACTEC se utiliza para probar la contaminación bacteriana. Los viales de cultivo BACTEC apoyan el crecimiento de microorganismos aeróbicos comunes y se inoculan con una jeringa estéril que contiene 1-3 ml de medio de cultivo. La detección del crecimiento se realiza con el instrumento BACTEC 9050, que mide los aumentos de la concentración de CO₂ a lo largo del tiempo. Este ensayo se realiza en el CVPF de acuerdo con la SOP 0361, que se proporciona en otro lugar en este documento. La sensibilidad de esta prueba en el laboratorio de CVPF no se ha confirmado, pero los estudios publicados indican que BACTEC es más sensible, más rápido en la detección, menos propenso a resultados falsos positivos que el método CFR (Khuu et al, 2004 y 2006).

Presencia y cantidad de hongos.

60 La presencia de hongos en cultivos de células T transducidos se evaluó intentando cultivar bacterias utilizando material de los cultivos de células T transducidos. La prueba de contaminación fúngica se realiza en los laboratorios de microbiología clínica HUP utilizando Agar Sabouraud infusión de cerebro corazón basado en la formulación de Gorman, 1967. El medio está optimizado para mejorar la recuperación fúngica y también contiene varios agentes antimicrobianos para impedir el crecimiento de bacterias que podrían competir con el crecimiento de hongos. El medio de cultivo se inocula por rayas. Se siguen los cultivos durante 14 días para determinar el negativo. La sensibilidad de este ensayo no ha sido determinada por el Laboratorio de Microbiología Clínica. Los controles

positivos para este ensayo incluyen tres hongos, Blastomyces dermatitidis, Candida albicans y Trichophyton mentagrophytes, que deberían crecer para indicar medios viables. Para controlar la potencia de los agentes antimicrobianos, las placas de control se inoculan con Escherichia coli y se debe observar una inhibición parcial a completa.

5 Almacenamiento

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

Descongelación celular

15 Después de registrar las células en la farmacia en investigación, las células congeladas se transportan en hielo seco a la cabecera del sujeto. Las células se descongelan junto a la cama, una bolsa cada vez usando un baño de agua mantenido entre 36 °C y 38 °C. La bolsa se masajea suavemente hasta que las células se hayan descongelado. No debe haber acumulaciones congeladas en el recipiente.

Administración/Infusión

20 Las infusiones comienzan de 1 a 2 días después de completar la quimioterapia. El día de las primeras infusiones, los pacientes tienen un CBC con diferencial y una evaluación de los recuentos de CD3, CD4 y CD8, ya que la quimioterapia se administra en parte para inducir linfopenia. Sin desear estar ligado a ninguna teoría particular, se cree que una dosis i.v. inicial de $2,5-5 \times 10^9$ células CART-19 es óptima para este protocolo. Debido a que hay aproximadamente 1×10^{12} células T en un adulto sano, la dosis total propuesta es equivalente a aproximadamente el 0,5% de la masa corporal total de las células T (Roederer, 1995, Nat Med, 1: 621-7; Macallan et al., 2003, Eur J Immunol, 33: 2316-26). La primera dosis se administra mediante una dosis dividida los días 0 (10%), 1 (30%) y 2 (60%). Los sujetos reciben infusión en una habitación aislada. Las células se descongelan junto a la cama del paciente como se describe en otra parte del presente documento. Las células descongeladas se administran a una velocidad de infusión tan rápido como se tolera, de modo que la duración de la infusión es de aproximadamente 10-15 minutos. Las células T transducidas se administran mediante infusión intravenosa rápida a una velocidad de flujo de aproximadamente 10 ml a 20 ml por minuto a través de un equipo de transfusión de sangre de tipo Y libre de látex de calibre 18 con una llave de paso de 3 vías. La duración de la infusión es de aproximadamente 15 minutos. Una o dos bolsas de células modificadas con CART-19 se entregan en hielo, y las células se administran al sujeto mientras están frías. En sujetos que reciben mezclas de células CART-19, para facilitar la mezcla, las células se administran simultáneamente utilizando un adaptador en Y. Los sujetos se infunden y premedican como se describe en otra parte del presente documento. Los signos vitales de los sujetos se evalúan y la oximetría de pulso se realiza antes de la dosificación, al final de la infusión y cada 15 minutos a partir de entonces durante 1 hora y hasta que sean estables y satisfactorios. Se obtiene una muestra de sangre para determinar el nivel basal de CART-19 antes de la infusión y 20 minutos después de la infusión. Los pacientes que experimentan toxicidades de su quimioterapia citorreductora anterior tienen un retraso en el programa de infusión hasta que estas toxicidades se hayan resuelto. Las toxicidades específicas que justifican el retraso de las infusiones de células T incluyen: 1) Pulmonar: requerimiento de oxígeno suplementario para mantener la saturación superior al 95% o presencia de anomalías radiográficas en las radiografías de tórax que son progresivas; 2) Cardíaca: nueva arritmia cardíaca no controlada con tratamiento médico. 3) Hipotensión que requiere soporte presor. 4) Infección activa: hemocultivos positivos para bacterias, hongos o virus dentro de las 48 horas posteriores a la infusión de células T. Se recoge una muestra de suero para el potasio y el ácido úrico antes de la primera infusión y dos horas después de cada infusión posterior.

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para analizar una célula T modificada genéticamente para detectar al menos un contaminante, en el que dicho al menos un contaminante se selecciona del grupo que consiste en lentivirus competente para la replicación (RCL), p24, ácido nucleico de virus de la estomatitis vesicular G (VSV-G) y gag del virus de inmunodeficiencia humana (VIH); dicho método comprende
- 5
- a) centrifugar un cultivo de dicha célula T modificada, realizar un ensayo de PCR para evaluar VSV-G y gag de VIH en el sedimento de centrifugación, y realizar ELISA para p24 en el sobrenadante de centrifugación para detectar el lentivirus competente para la replicación (RCL);
- 10
- b) realizar un ELISA para detectar p24; o
- c) realizar un ensayo de PCR cuantitativo para detectar el ácido nucleico de VSV-G;
- 15
- en donde la célula T modificada genéticamente comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, una región de señalización coestimuladora y un dominio de señalización.
2. El método de la reivindicación 1, en el que las células T modificadas genéticamente se modificaron genéticamente mediante transducción con un vector lentiviral.
- 20
3. El método de la reivindicación 1, en el que el contaminante puede ser adicionalmente al menos uno seleccionado del grupo que consiste en endotoxina, en el que dicha endotoxina se detecta preferiblemente realizando un ensayo de coágulo de gel, micoplasma, en el que dicho micoplasma se detecta preferiblemente mediante la realización de un ensayo mycoalert, perlas recubiertas de anti-CD3/anti-CD28 residual, anticuerpos de ratón, suero humano combinado, albúmina de suero bovino, suero bovino, componentes de medios de cultivo, células de empaquetamiento vectorial o componentes de plásmidos, una bacteria, en donde dicha bacteria se detecta preferiblemente al realizar un ensayo BACTEC y un hongo, en el que dicho hongo se detecta preferiblemente mediante el cultivo de hongos.
- 25
4. El método de la reivindicación 3, en el que la bacteria es al menos una seleccionada del grupo que consiste en *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia* y *Streptococcus* puse grupo A.
- 30
5. El método de la reivindicación 1, en el que el dominio de señalización es un dominio de señalización CD3-zeta.
- 35
6. El método de la reivindicación 1, en el que el dominio de unión a antígeno es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
7. El método de la reivindicación 6, en el que el fragmento de unión a antígeno es un Fab o un scFv.
- 40
8. El método de la reivindicación 1, en el que el dominio de unión a antígeno se une a un antígeno tumoral.
9. El método de la reivindicación 8, en el que el antígeno tumoral está asociado con una enfermedad hematológica maligna.
- 45
10. El método de la reivindicación 8, en el que el antígeno tumoral está asociado con un tumor sólido.
11. El método de la reivindicación 8, en el que el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, glicolípidos F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR, y cualquier combinación de los mismos.
- 50
12. El método de la reivindicación 1, en el que la región de señalización coestimuladora comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83, y cualquier combinación de los mismos.
- 55
13. El método de la reivindicación 1, en el que dicho ensayo de PCR para detectar el ácido nucleico de VSV-G en dicha alternativa a) es un ensayo de PCR cuantitativo.
- 60
14. El método de la reivindicación 13, en el que dicho ensayo de PCR cuantitativa en dicha alternativa a) se realiza usando una curva estándar de cantidades de VSV-G conocidas.
15. El método de la reivindicación 1, en el que dicho ensayo de PCR cuantitativa para detectar el ácido nucleico de VSV-G en la alternativa c) se realiza usando una curva estándar de cantidades conocidas de VSV-G.
- 65
16. El método de la reivindicación 1, en el que dicho contaminante es p24 y en el que dicho método comprende un

ELISA para detectar p24.

- 5 17. El método de la reivindicación 1, en el que dicho contaminante es RCL y en el que dicho método comprende centrifugar un cultivo de dichas células T modificadas, realizar un ensayo de PCR que evalúa el VSV-G y un ensayo de PCR que evalúe la presencia de gag de VIH en el sedimento de centrifugación, y realizar ELISA para p24 en el sobrenadante de centrifugación.

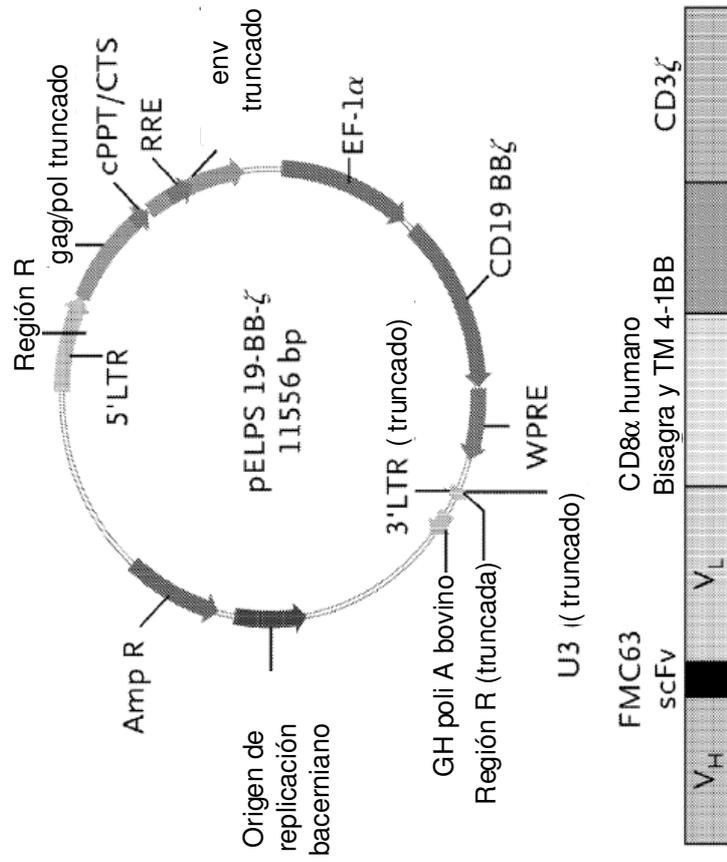


Figura 1A HOJA DE SUSTITUCIÓN

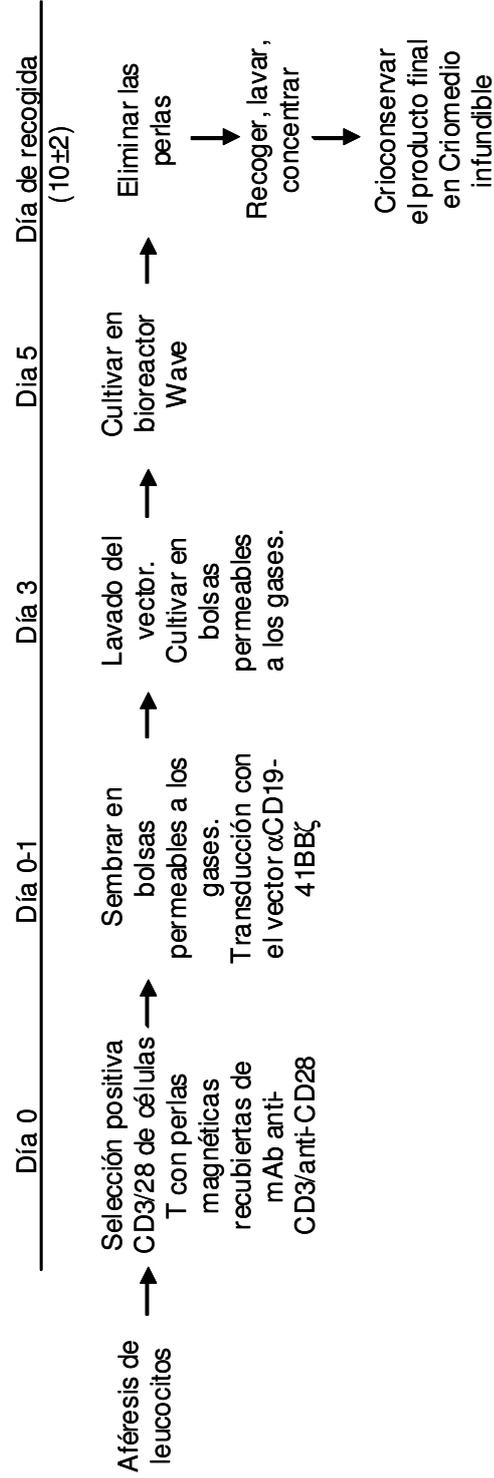


Figura 1B HOJA DE SUSTITUCIÓN

Proceso de fabricación de células T CART-19

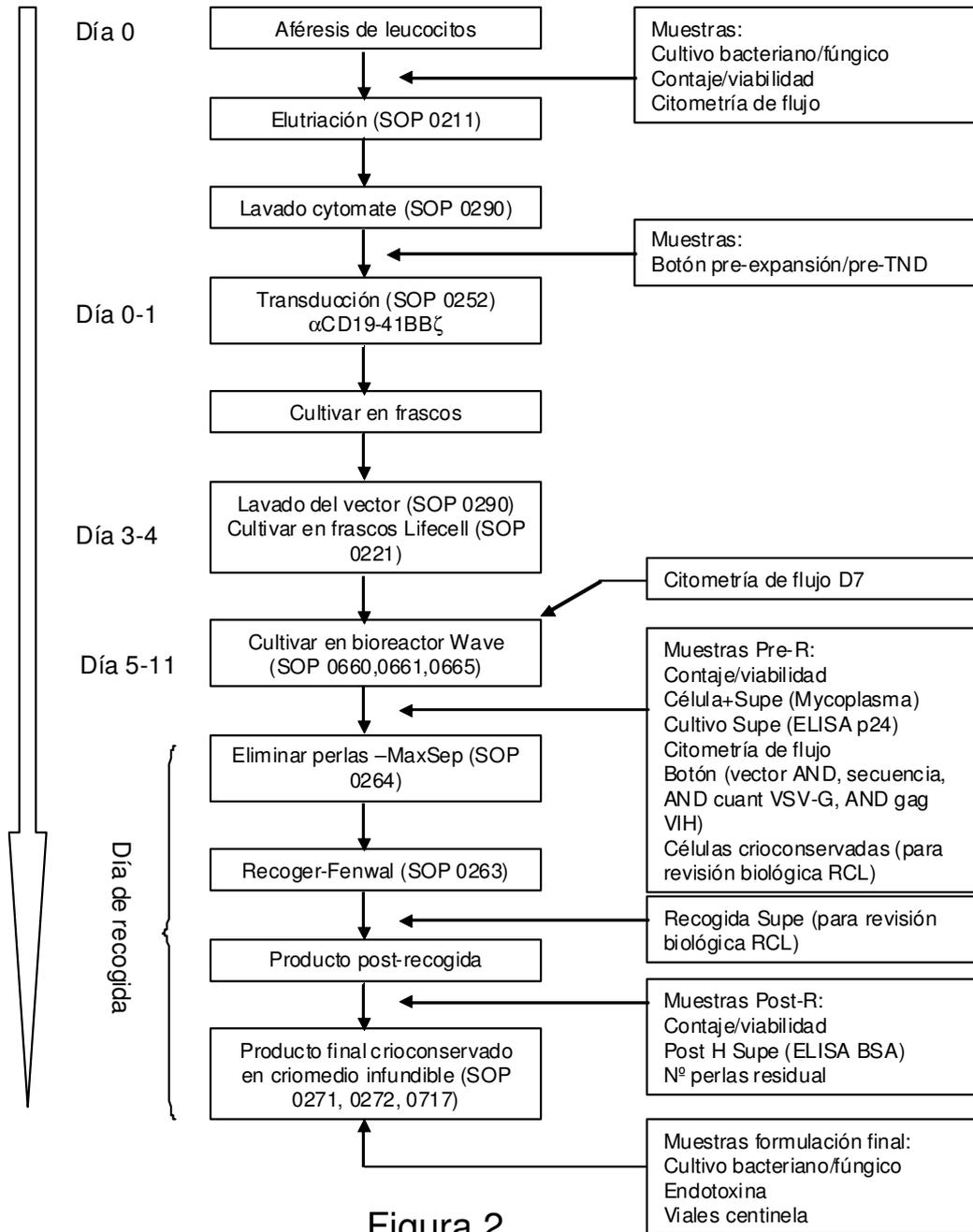


Figura 2

Prueba	Método	Criterios	Sensibilidad	Especificidad
Viabilidad celular en tubos centinela	Exclusión con azul tripano	≥70%	N/A	N/A
% Células T CD3 positivo	Citometría de flujo	≥80%	1 en 20.000 células	Células CD3+
Nº de perlas residuales	Visual	≤100 perlas/3e6 células	1 perla/3e6 células	No aplicable
Endotoxina	Coágulo de gel	≤3,5 UE/mL	0,125 UE/mL	endotoxina bacteria Gram negativa
Mycoplasma	Ensayo MycoAlert	Negativo	<50 ufc/mL	mycoplasma
RCL (VIHgag)	PCR	Negativo	≥30 copias/μg ADN genómico	gag de VIH 1299-1377 (región ausente en el vector lentiviral)
Eficiencia de transducción (expresión de scFv)	Citometría de flujo	≥20% positivo	1 en 20.000 células	fragmento variable de cadena sencilla murino
ELISA antígeno p24 de VIH-1	ELISA	<10 pg/mL	0-4000 pg/mL	antígeno p24 de VIH-1 en suero humano, plasma, sobrenadante de cultivo celular
Eficiencia de transducción (nº de copias)	QT-PCR	media ≥0,2 copias por célula	10 copias/μg ADN genómico	región específica de vector CART-19 del dominio de señalización intracelular del CAR
ADN de VSV-G	QT-PCR	Negativo	25 copias/μg ADN genómico	proteína G de VSV
BSA	ELISA	≤1μg/mL	250 pg/mL	BSA
Cultivo bacteriano	Cultivo	Sin crecimiento	a determinar	Alcaligenes faecalis, Candida albicans, Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, S. pyogenes grupo A
Cultivo fúngico	Cultivo	Sin crecimiento	a determinar	a determinar

Figura 3

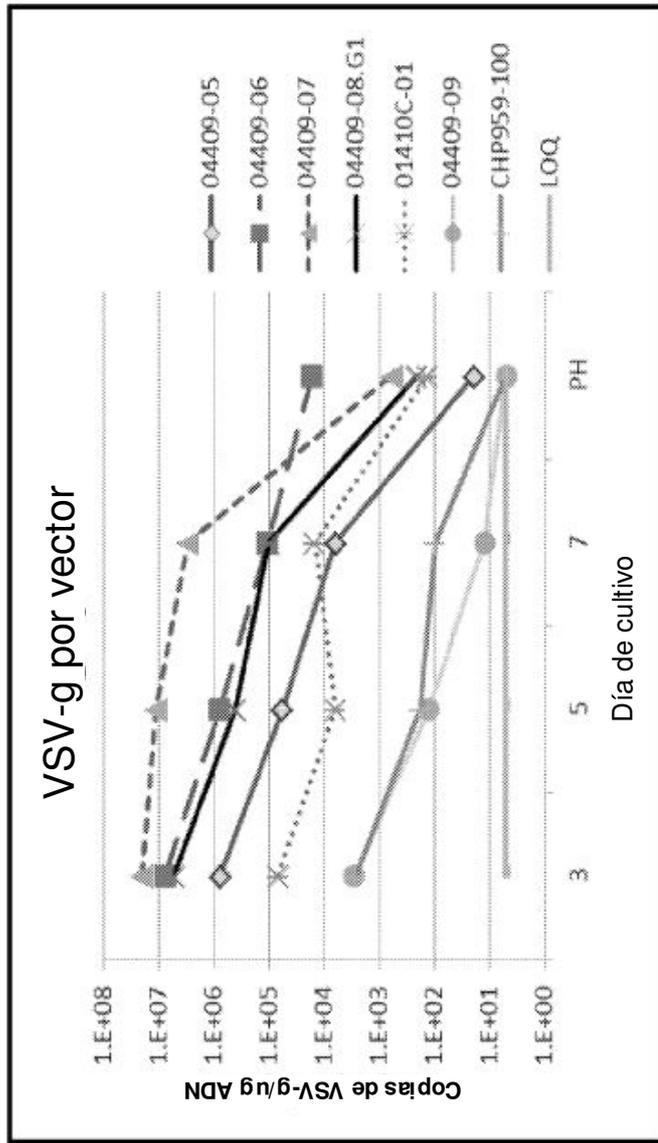


Figura 4
HOJA DE SUSTITUCIÓN

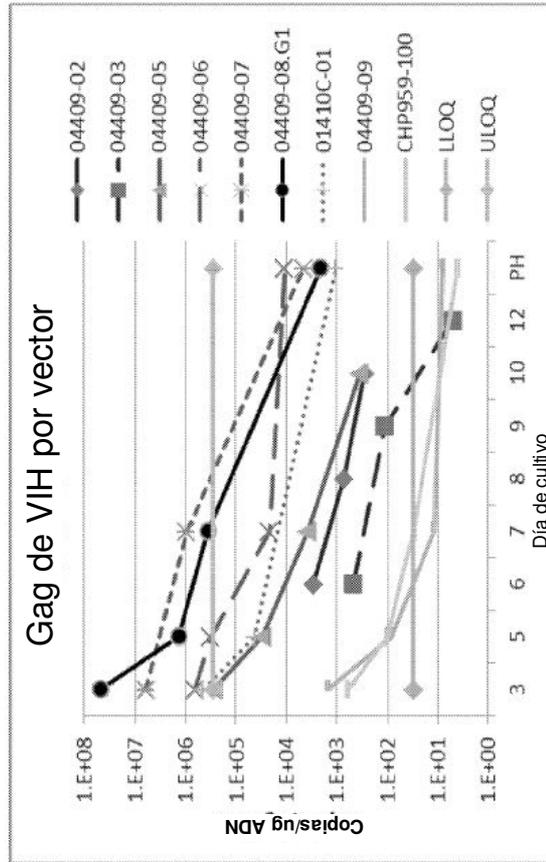


Figura 5
HOJA DE SUSTITUCIÓN