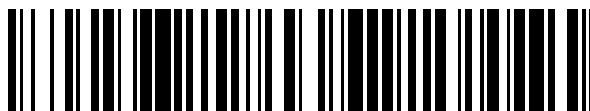


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 738**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 14/35** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2013 PCT/US2013/063097**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO14055668**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2013 E 13844468 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 2903637**

54 Título: **Composiciones y métodos para inmunoterapia**

30 Prioridad:

**02.10.2012 US 201261709072 P**

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

**20.02.2020**

73 Titular/es:

**MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER  
CENTER (100.0%)  
1275 York Avenue  
New York, NY 10065 , US**

72 Inventor/es:

**KLOSS, CHRISTOPHER C. y  
SADELAIN, MICHEL**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 743 738 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

Composiciones y métodos para inmunoterapia

5 **Antecedentes de la invención**

10 C Cáncer de próstata es el cáncer más frecuente en varones en Estados Unidos y la causa de casi 31.000 muertes al año. Cuando se diagnostica de manera temprana, el cáncer puede tratarse eficazmente mediante cirugía o radiación. La enfermedad residual tras la cirugía requiere radiación y/o terapia hormonal, lo cual puede prevenir la progresión tumoral y la metástasis. En la actualidad, no existe ningún tratamiento curativo para el cáncer de próstata metastásico que no responde al tratamiento hormonal. La inmunoterapia es una terapia dirigida que en principio proporciona el tratamiento de tales cánceres.

15 Wilkie *et al.* (2012) dan a conocer la selección doble como diana de ErbB2 y MUC I en cáncer de mama usando receptores de antígeno quiméricos modificados por ingeniería para proporcionar señalización complementaria. Sadelain *et al.* (2003) dan a conocer que la modificación genética de linfocitos T es un enfoque importante para investigar la biología de células T normales y aumentar la inmunidad antitumoral. Sadelain *et al.* revisan estrategias genéticas dirigidas a aumentar el reconocimiento de antígenos tumorales, potenciar actividades antitumorales y prevenir el funcionamiento defectuoso de células T. Morgan *et al.* (2010) dan a conocer un caso clínico de un acontecimiento adverso grave tras la administración de células T transducidas con un receptor de antígeno quimérico que reconoce ERBB2. Portell *et al.* (2012) revisan la terapia con anticuerpos para leucemia linfoblástica aguda (ALL) y evalúan cuatro antígenos en ALL (CD20, CD22, CD52 y CD19) y estrategias terapéuticas para seleccionarlos como diana.

25 Las terapias con células T dirigidas que usan células T autólogas genéticamente modificadas están comenzando a mostrar evidencias de eficacia terapéutica en melanoma y tumores malignos de células B inactivos. Las estrategias de modificación por ingeniería de células T actuales vuelven a dirigir células T del paciente hacia antígenos tumorales a través de un receptor de células T (TCR) transducido o un receptor de antígeno quimérico (CAR). Sin embargo, la recién encontrada capacidad de inducir potentes respuestas inmunitarias implica la necesidad de confinar los ataques inmunitarios al tumor y evitar reacciones contra tejidos normales que pueden expresar el antígeno seleccionado como diana. Desgraciadamente, la disponibilidad limitada de antígenos realmente restringidos al tumor con frecuencia impide lograr un direccionamiento altamente específico. Entre las limitaciones que impiden lograr un direccionamiento altamente específico se encuentra la disponibilidad limitada de antígenos realmente restringidos al tumor. Por consiguiente, se requieren con urgencia nuevos métodos de tratamiento de neoplasia.

35 **Sumario de la invención**

La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

40 Se dan a conocer células inmunosensibles, incluyendo células T y linfocitos citolíticos naturales (NK), que expresan un receptor de unión a antígeno (por ejemplo, CAR o TCR) que tiene actividad de activación de células inmunitarias y un receptor coestimulante quimérico (CCR), y métodos de uso de las mismas para el tratamiento de neoplasia, enfermedad infecciosa y otras patologías.

45 Además se da a conocer una célula inmunosensible aislada que tiene un receptor de reconocimiento de antígeno que se une a un primer antígeno con baja afinidad, en la que la unión activa la célula inmunosensible, y un receptor coestimulante quimérico (CCR) que se une a un segundo antígeno y estimula la célula inmunosensible.

50 En un aspecto, la presente invención proporciona una célula inmunosensible que comprende:

(a) un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une a un primer antígeno y que tras su unión a dicho primer antígeno puede suministrar una señal de activación a la célula inmunosensible, CAR que se une a dicho primer antígeno con una  $K_d$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o más, mediante lo cual dicha célula inmunosensible muestra actividad citolítica sustancialmente nula o despreciable contra células que son positivas de manera individual para dicho primer antígeno, y

(b) un receptor coestimulante quimérico (CCR) que se une a un segundo antígeno que es diferente del primer antígeno y que tras su unión a dicho segundo antígeno puede suministrar una señal coestimulante a la célula inmunosensible, mediante lo cual la célula inmunosensible muestra un mayor grado de actividad citolítica contra células que son positivas tanto para el primer antígeno como para el segundo antígeno en comparación con células que son positivas de manera individual para el primer antígeno.

65 Se da a conocer un método de inducción de muerte de células tumorales en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de una célula inmunosensible que comprende un receptor de reconocimiento de antígeno que se une a un primer antígeno con baja afinidad, en el que la unión activa la célula inmunosensible, y un

receptor coestimulante quimérico (CCR) que se une a un segundo antígeno y estimula la célula inmunosensible, induciendo de ese modo muerte de células tumorales en el sujeto.

5 Se da a conocer un método de tratamiento o prevención de una neoplasia en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de una célula inmunosensible que comprende un receptor de reconocimiento de antígeno que se une a un primer antígeno con baja afinidad, en el que la unión activa la célula inmunosensible, y un receptor coestimulante quimérico (CCR) que se une a un segundo antígeno y estimula la célula inmunosensible, tratando o previniendo de ese modo una neoplasia en el sujeto.

10 Se da a conocer un método de tratamiento cáncer de próstata en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una célula T que comprende un receptor de reconocimiento de antígeno que se une a PSCA o CD19 con baja afinidad, en el que la unión activa la célula inmunosensible, y un receptor coestimulante quimérico (CCR) que se une a PSMA y estimula la célula inmunosensible, tratando de ese modo cáncer de próstata en el sujeto.

15 Se da a conocer un método para producir una célula inmunosensible específica de antígeno, implicando el método introducir en la célula inmunosensible una secuencia de nucleótidos que codifica para un receptor coestimulante quimérico (CCR), en el que el receptor coestimulante quimérico tiene un dominio de unión a antígeno acoplado a un dominio de señalización intracelular que estimula una célula inmunosensible, en el que la célula inmunosensible tiene un receptor de reconocimiento de antígeno que se une a un primer antígeno con baja afinidad, en el que la unión activa la célula inmunosensible.

20 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para producir *in vitro* una célula inmunosensible específica de antígeno, comprendiendo el método:

25 introducir en la célula inmunosensible una primera secuencia de nucleótidos que codifica para un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une a un primer antígeno y que tras la unión al primer antígeno puede suministrar una señal de activación a la célula inmunosensible, CAR que se une a dicho primer antígeno con una  $K_d$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o más, mediante lo cual dicha célula inmunosensible muestra actividad citolítica sustancialmente nula o despreciable contra células que son positivas de manera individual para dicho primer antígeno; e

30 introducir en la célula inmunosensible una segunda secuencia de nucleótidos que codifica para un receptor coestimulante quimérico (CCR) que se une a un segundo antígeno que es diferente del primer antígeno y que tras la unión al segundo antígeno puede suministrar una señal coestimulante a la célula inmunosensible,

35 mediante lo cual la célula inmunosensible muestra un mayor grado de actividad citolítica contra células que son positivas para los antígenos tanto primero como segundo en comparación con células que son positivas de manera individual para el primer antígeno.

40 Se da a conocer una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una célula inmunosensible de la invención (por ejemplo, una célula T específica de antígeno tumoral en una composición farmacéutica para el tratamiento de neoplasia) en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

45 En un aspecto relacionado, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una célula inmunosensible de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula inmunosensible de la presente invención para su uso en el tratamiento o la prevención de un neoplasma, o la inducción de muerte de células tumorales en un sujeto.

50 En aún otro aspecto, la presente invención proporciona una célula T para su uso en el tratamiento de cáncer de próstata, en la que la célula T comprende:

55 un receptor de antígeno quimérico que se une a PSCA y que tras la unión a PSCA puede activar la célula T, CAR que se une a PSCA con una  $K_d$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o más, mediante lo cual dicha célula T muestra actividad citolítica sustancialmente nula o despreciable contra células que son positivas de manera individual para PSCA, y

un receptor coestimulante quimérico (CCR) que se une a PSMA y que tras la unión a PSMA puede suministrar una señal coestimulante a la célula T,

60 mediante lo cual la célula T muestra un mayor grado de actividad citolítica contra células que son positivas tanto para PSCA como para PSMA en comparación con células que son positivas de manera individual para PSCA.

65 Se da a conocer un kit para el tratamiento de una neoplasia, infección por patógeno, un trastorno autoinmunitario o un trasplante alogénico, conteniendo el kit una célula inmunosensible que tiene un receptor de reconocimiento de antígeno que se une a un primer antígeno y activa la célula inmunosensible, y un receptor coestimulante quimérico (CCR) que se une a un segundo antígeno viral y estimula la célula inmunosensible. El kit puede comprender además

instrucciones escritas para usar la célula inmunosensible para el tratamiento de un sujeto que tiene una neoplasia, una infección por patógeno, un trastorno autoinmunitario o un trasplante alogénico.

5 En diversos ejemplos dados a conocer en el presente documento, la célula inmunosensible se selecciona como que tiene un receptor de reconocimiento de antígeno con baja afinidad. Esto puede implicar seleccionar la célula inmunosensible como que tiene un receptor de reconocimiento de antígeno que se une a un primer antígeno con baja afinidad. En diversos ejemplos de cualquiera de los aspectos dados a conocer en el presente documento, el receptor de reconocimiento de antígeno se selecciona como que tiene baja afinidad para la expresión en la célula.

10 Esto puede implicar introducir una segunda secuencia de nucleótidos que codifica para un receptor de antígeno quimérico, en el que el receptor de antígeno quimérico comprende un segundo dominio de unión a antígeno acoplado a un segundo dominio de señalización intracelular que activa una célula inmunosensible. El receptor de reconocimiento de antígeno de la célula inmunosensible de la presente invención es un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une a un primer antígeno y que tras su unión a dicho primer antígeno puede suministrar una señal de activación a la célula inmunosensible, CAR que se une a dicho primer antígeno con una  $K_d$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o más, mediante lo cual dicha célula inmunosensible muestra actividad citolítica sustancialmente nula o despreciable contra células que son positivas de manera individual para dicho primer antígeno. En diversas realizaciones de la presente invención, el dominio de señalización intracelular de dicho receptor de reconocimiento de antígeno es el dominio de señalización de cadena CD3. En diversas realizaciones, el dominio de señalización intracelular del receptor coestimulante quimérico (CCR) es un dominio de señalización de CD97, CD11a-CD18, CD2, ICOS, CD27, CD154, CD5, OX40, 4-1BB o CD28.

20 En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, el receptor de reconocimiento de antígeno es exógeno o endógeno. En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, el receptor de reconocimiento de antígeno se expresa de manera recombinante. En diversas realizaciones, el receptor de reconocimiento de antígeno se expresa a partir de un vector. En diversas realizaciones, el receptor coestimulante quimérico (CCR) se expresa a partir de un vector. En realizaciones particulares, la célula inmunosensible expresa un receptor de antígeno recombinante o endógeno que es 19z1 o Pz1.

30 En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, la célula inmunosensible es una célula T, un linfocito citolítico natural (NK), un linfocito T citotóxico (CTL), una célula T reguladora, una célula madre embrionaria humana o una célula madre pluripotente a partir de la cual pueden diferenciarse células linfoides. En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, la célula inmunosensible según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que dicha célula inmunosensible es autóloga.

35 En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, el antígeno es un antígeno tumoral o de patógeno. En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, uno o más dominios de unión a antígeno son dominios de unión a antígeno tumoral. En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, los antígenos o antígenos tumorales se seleccionan de CAIX, CEA, CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD133, CD138, un antígeno de célula infectada por citomegalovirus (CMV), EGP-2, EGP-40, EpCAM, erb-B2, erb-B3, erb-B4, FBP, receptor de acetilcolina fetal, receptor de folato-a, GD2, GD3, HER-2, hTERT, IL13R-a2, cadena ligera x, KDR, LeY, molécula de adhesión celular LI, MAGE-AI, MUC1, mesotelina, ligandos de NKG2D, NY-ES0-1, antígeno oncofetal (h5T4), PSCA, PSMA, ROR1, TAG-72, VEGF-R2 y WT-1. En diversas realizaciones, los antígenos primero y segundo se seleccionan de CD133, un antígeno de célula infectada por citomegalovirus (CMV), erbB2, KDR mesotelina, ligandos de NKG2D, NYES0-1, antígeno oncofetal (h5T4), PSCA, PSMA, CD19, VEGF-R2 y WT-1. En realizaciones particulares, los antígenos primero y segundo se seleccionan de HER2, MUC1, CD44, CD49f, EpCAM, CEA, CD133, un antígeno de célula infectada por citomegalovirus (CMV), EGP-2, EGP-40, EpCAM, erb-B2, erb-B3, erb-B4, FBP, KDR, mesotelina, ligandos de NKG2D, NYES0-1, antígeno oncofetal (h5T4), PSCA, PSMA, VEGF-R2 o WT-1. En realizaciones específicas, los antígenos primero y segundo se seleccionan de CD10 y CD19.

50 En otras realizaciones, los antígenos primero y segundo se seleccionan de CD56 y CD138. En determinadas realizaciones, los antígenos primero y segundo se seleccionan de mesotelina, receptor de folato-a, CD44 y CD133.

55 En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, la neoplasia se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de mama, leucemia de células B, mieloma múltiple y cáncer de ovarios. En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, el método reduce el número de células tumorales, reduce tamaño tumoral y/o erradica el tumor en el sujeto.

60 En diversas realizaciones, la neoplasia es cáncer de próstata y los antígenos tumorales primero y segundo son antígenos distintos seleccionados de PSCA, PSMA, CD19, CD133, un antígeno de célula infectada por citomegalovirus (CMV), erb-B2, KDR, mesotelina, ligandos de NKG2D, NY-ES0-1, antígeno oncofetal (h5T4), VEGF-R2 y WT-I. En diversas realizaciones, la neoplasia es cáncer de mama y los antígenos tumorales primero y segundo son antígenos distintos seleccionados de HER2, MUC1, CD44, CD49f, EpCAM, CEA, CD133, un antígeno de célula infectada por citomegalovirus (CMV), EGP-2, EGP-40, EpCAM, erb-B2,3,4, FBP, KDR, mesotelina, ligandos de NKG2D, NY-ES0-1, antígeno oncofetal (h5T4), PSCA, PSMA, VEGF-R2 o WT-1. En realizaciones particulares, la neoplasia es leucemia de células B y los antígenos tumorales primero y segundo se seleccionan de CD10 y CD19. En determinadas realizaciones, la neoplasia es mieloma múltiple y los antígenos tumorales primero y segundo se seleccionan de CD56

y C0138. En diversas realizaciones, la neoplasia es cáncer de ovarios y los antígenos tumorales primero y segundo son antígenos distintos seleccionados de mesotelina, receptor de folato-a, CD44 y CD133.

La invención proporciona composiciones y métodos que proporcionan el direccionamiento de células T a células tumorales. Se aislaron composiciones y artículos definidos por la invención o se fabricaron de otro modo en relación con los ejemplos proporcionados a continuación. Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada y a partir de las reivindicaciones.

### Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-C son gráficos que representan el diseño y la expresión de vector de receptor de antígeno quimérico (CAR) y receptor coestimulante quimérico (CCR) mediante transducción de células T humanas primarias. (A) representa la generación de CAR mediante fusión de cadenas pesada y ligera de dominios variables de inmunoglobulina al dominio transmembrana de CDS, que se fusiona a los dominios de señalización de CD3 citosólicos. Usando un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para permitir la expresión bicistrónica, puede detectarse fácilmente la expresión de CAR mediante correlación con fluorescencia de dsRED (datos no mostrados). El CCR se generó fusionando un scFv a un dominio transmembrana y de señalización de CD28<sup>15</sup> fusionado a un dominio de señalización citosólico de 4-1BB (también conocido como CD137).<sup>21</sup> La expresión de CCR puede correlacionarse con la expresión bicistrónica de hrGFP (datos no mostrados). Abreviaturas: LTR - repetición terminal larga; SD - sitio donador de corte y empalme; SA - sitio aceptor de corte y empalme; VH o VL - dominios pesado o ligero variables, respectivamente; EC - dominio extracelular; TM - dominio transmembrana; C - dominio citosólico; IRES - sitio interno de entrada al ribosoma; dsRED - proteína roja fluorescente de *Discosoma sp.*, hrGFP - proteína verde fluorescente recombinante humana. (B) representa eficiencias de transducción representativas de células T humanas primarias usando estos vectores retrovirales. (C) representa la transducción de CTL con CAR diferentes y múltiples para los presentes estudios.

Las figuras 2A-D muestran que la activación de células T humanas mediada por CAR/CCR, de receptor doble, permitió una función de CTL robusta, proliferación a largo plazo y erradicación de tumor potenciada tras la unión de dos antígenos. (A) muestra que las células T que expresan receptores quiméricos produjeron la lisis de células positivas para antígeno cuando el CAR específico para CD19 se expresa por las células T en ensayos de CTL, en comparación con células T no transducidas o transducidas con P28BB. Las representaciones gráficas son representativas de  $n > 4$  experimentos, con barras de error que representan la desviación estándar de la media de 3 repeticiones. (B) muestra la proliferación a largo plazo de células T mediante cuentas de células T absolutas a lo largo de 31 días de células T que expresaban ninguno, uno o ambos de los receptores quiméricos que se cultivaron conjuntamente con líneas de células tumorales humanas que expresaban ambos o cualquiera de los antígenos solos. Las flechas indican la nueva estimulación de células T usando células tumorales recién irradiadas. Sólo se observa proliferación a largo plazo robusta cuando células T que expresan receptor doble encuentran ambos antígenos. Las representaciones gráficas son representativas de  $n > 4$  experimentos con barras de error que representan la desviación estándar de la media de 3 repeticiones. (C) representa la eficacia de la erradicación de tumor sistémica mediante células T que detectan tumores (TTS) evaluada mediante infusión de  $1,0 \times 10^6$  células T por vía intravenosa (i.v.) en ratones NSG que portan tumor de próstata humano PC3 CD19<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup> que expresa luciferasa. Se midió cuantitativamente la carga tumoral semanalmente usando BLI. Se muestran imágenes de dos ratones representativos de cada grupo con la intensidad en píxeles a partir de la luminiscencia de tumores representada en color. Se representó gráficamente un promedio de la carga tumoral con barras de error que representan la desviación estándar a partir de la media de valores de 6 ratones por grupo. (D) representa la erradicación selectiva de tumores DP usando un modelo de ratón de tres tumores inyectando por vía subcutánea  $1 \times 10^6$  células de tumor PC3, cada una de las células positivas para CD19 solo en los costados izquierdos, células positivas para PSMA solo en los costados derechos, y células positivas tanto para CD19 como para PSMA en los lomos de los ratones. Se aplicaron por infusión intravenosa células T que expresaban 19z1, P28BB o ambos de 19z1 + P28BB de los receptores quiméricos 7 días tras la infusión de tumor. Se muestran imágenes representativas de 2 ratones por grupo que portan estos tumores con luminiscencia de los tumores representada en color. Se midieron cuantitativamente los tumores usando calibres y se representaron gráficamente los volúmenes tumorales frente al tiempo para cada tumor. Las barras de error representan la desviación estándar a partir de la media de 6 ratones. Se determinó la significación estadística usando pruebas t para datos independientes bilaterales para comparar valores obtenidos a partir de células T 19z1 y células T 19z1 + P28BB y los valores p se representan como \* para  $<0,05$  o \*\* para  $<0,01$ .

Las figuras 3A-E representan que las células T que detectan tumores (TTS) erradicaron de manera selectiva tumores de próstata humanos cuando se seleccionaron como diana dos antígenos de tumor de próstata. (A) representa la evaluación de tres scFv diferentes específicos para PSCA para su ensamblaje para dar anticuerpos biespecíficos que también contienen especificidad para CD3. Se cultivaron conjuntamente células T a una razón de 20:1 con células de tumor PC3 PSCA<sup>+</sup> y se añadieron anticuerpos a diversas cantidades y se midió la lisis específica. (B) representa la generación de CAR usando los scFv anti-PSCA que presentan una eficacia variada en ensayos de citotoxicidad. La lisis específica mediada por CAR de células diana que expresaban PSCA corroboró la eficacia reducida del scFv de Lz1 requiriendo una razón de efector: diana 50 veces superior para lograr el mismo nivel de lisis que el de cualquiera de Hzl o Mzl. (C) y (D) representan la erradicación selectiva de tumores de próstata sistémicos que expresaban PSCA y PSMA que se investigó usando estos scFV ineficaces. Se establecieron tumores (figura 5) y se trataron tal como se

describió en la figura 2. Después de 14 días, se aplicaron por infusión intravenosa  $1,0 \times 10^6$  células T positivas para receptor quimérico para Mzl +P28BB (figura 3C) o Lzl + P28BB (figura 3D). Se muestran imágenes de dos ratones representativos de cada grupo con luminiscencia a partir de tumores representada en color (desde azul =  $5 \times 10^5$  hasta rojo =  $2 \times 10^7$  fotones). Se cuantificó la carga tumoral promedio mediante luminiscencia y se representó gráficamente con barras de error que representan la desviación estándar a partir de la media de valores de 5 ratones por grupo. Dos ratones que recibieron tumor PSMA (línea verde) murieron después del día 49 y por tanto se calculó el promedio del valor medio para la luminiscencia a partir de 3 valores para los días 56 y 63. La figura 3E muestra que respuestas antitumorales selectivas únicamente frente a tumores PSCA<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup> se lograron mediante células T Lzl + P28BB en ratones que también tenían tumores PSCA-PSMA<sup>+</sup> y PSCA<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup>, de manera similar a la figura 2D. Se determinó la significación estadística usando pruebas t para datos independientes bilaterales para comparar valores obtenidos a partir de células T Lzl y células T Lzl + P28BB y los valores p se representan como \* para <0,05 o \*\* para <0,01.

Las figuras 4A-D representan la secreción de citocinas potenciada y la expresión de Bc1xL que se encuentra mediante células TTS cuando se cultivan conjuntamente con tumores DP. (A) representa el análisis de citocinas de tipo multiplex de células T no transducidas o células T transducidas con 19z1, P28BB o ambos 48 horas tras la estimulación con primer antígeno usando o bien células de PC3 no transducidas (vacías) o bien células de PC3 CD19<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup>. Las barras de error representan la desviación estándar a partir de la media de 2 repeticiones biológicas. (B-D) representan el análisis de citocinas de tipo multiplex de células T no transducidas o células T transducidas con CAR anti-PSCA Hzl (B), Mzl (C) y Lzl (B), CCR P28BB, o ambos de CAR + CCR que se muestra 48 horas tras la estimulación con segundo antígeno usando o bien células vacías o bien células PC3 PSCA+PSMA<sup>+</sup>. (E) representa el análisis de inmunotransferencia de tipo Western para Bc1xL realizado usando lisados celulares de células T no transducidas o células T transducidas con 19z1, P28BB o ambos tras 24 horas tras la estimulación con antígeno inicial. Se usó la cantidad total de Akt como control de carga.

La figura 5 representa la generación de células de tumor de próstata para la expresión de proteína de fusión GFP-luciferasa de luciérnaga (GFP/Luc) y antígenos tumorales. Se transdujeron células PC3 no transducidas (vacías) con GFP/Luc y CD19, PSMA, PSCA o una combinación de dos antígenos usando constructos de expresión retrovirales. Se purificaron las células mediante FACS de pureza doble para GFP/Luc, CD19, PSMA y/o PSCA.

Las figuras 6A-C ilustran el concepto de células T que detectan tumores. (A) representa que las células TTS que expresan un CAR eficiente se estimulan de manera potente mediante células A<sup>+</sup>113<sup>+</sup> para facilitar la respuesta inmunitaria frente a células A<sup>+</sup>. Las células CAR<sup>+</sup>CCR<sup>+</sup> pueden unirse a células de antígeno tumoral A<sup>+</sup> con un CAR que suministra señales de activación de CD3. Esto puede dar como resultado lisis celular a corto plazo. Las células CAR<sup>+</sup>CCR<sup>+</sup> pueden unirse a células de antígeno tumoral B<sup>+</sup> con un CCR que suministra señales de CD28 y CD137. Esta señal por sí sola no es suficiente para inducir lisis o proliferación. Sólo cuando se unen células CAR<sup>+</sup>CCR<sup>+</sup> a células de antígeno tumoral A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> con un CAR y CCR puede proporcionarse tanto activación como estimulación. Esto da como resultado una lisis robusta, proliferación de células T, secreción de citocinas potenciada, regulación por incremento de BclxL, y la capacidad de erradicar de manera selectiva tumores *in vivo*. Sin embargo, dependiendo de la eficacia del CAR, estas células CAR<sup>+</sup>CCR<sup>+</sup> pueden recircular posiblemente para producir la lisis de células positivas de manera individual para antígeno específico para el CAR. La figura 6B representa que reduciendo la eficacia del CAR, las células TTS pueden rescatarse funcionalmente mediante unión a CCR cuando se encuentran células A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> para responder de manera selectiva y erradicar células A<sup>+</sup>13<sup>+</sup>, al tiempo que se evita la respuesta frente a células A<sup>+</sup>. (C) muestra que expresando de manera conjunta un CAR que suministra una señal de activación de TCR tras la unión a un antígeno tumoral y un segundo CAR que suministra señales de estimulación tras la unión a un antígeno tumoral diferente, los linfocitos T sólo erradicarán tumores que expresan ambos antígenos, pero no tumores que expresan cualquiera de los antígenos solos.

### Descripción detallada de la invención

La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

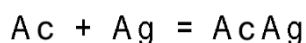
A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el significado habitualmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a un experto una definición general de muchos de los términos usados en esta invención: Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2ª ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5ª ed., R. Rieger *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Tal como se usan en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados que se les asignan a continuación, a menos que se especifique lo contrario.

Por "activa una célula inmunosensible" quiere decirse la inducción de transducción de señal o cambios en la expresión de proteína en la célula dando como resultado el inicio de una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, cuando se agrupan cadenas de CD3 en respuesta a la unión de ligando y motivos de inhibición basados en tirosina de inmunorreceptor (ITAM), se produce una cascada de transducción de señal. En determinadas realizaciones, cuando un TCR endógeno o un CAR exógeno se une a un antígeno, se produce una formación de una sinapsis inmunológica que incluye la agrupación de muchas moléculas cerca del receptor unido (por ejemplo CD4 o CD8, CD3 // /, etc.) Esta agrupación de moléculas de señalización unidas a membrana permite que los motivos ITAM contenidos dentro de las cadenas de

CD3 se fosforilen. Esta fosforilación inicia a su vez una ruta de activación de células T que en última instancia activa factores de transcripción, tales como NF-KB y AP-1. Estos factores de transcripción inducen expresión génica global de la célula T para aumentar la producción de IL-2 para la proliferación y expresar proteínas de células T reguladoras maestras con el fin de iniciar una respuesta inmunitaria mediada por células T. Por "estimula una célula inmunosensible" quiere decirse una señal que da como resultado una respuesta inmunitaria robusta y sostenida. En diversas realizaciones, esto se produce tras la activación de células inmunitarias (por ejemplo, células T) o está mediado de manera concomitante a través de receptores incluyendo, pero sin limitarse a, CD28, CD137 (4-1BB), OX40 e ICOS. Sin limitarse a ninguna teoría particular, recibir múltiples señales estimulantes es importante para montar una respuesta inmunitaria mediada por células T robusta y a largo plazo. Sin recibir estas señales estimulantes, las células T rápidamente se inhiben y se vuelven insensibles frente al antígeno. Aunque los efectos de estas señales coestimulantes varían y siguen parcialmente sin entenderse, generalmente dan como resultado un aumento de la expresión génica con el fin de generar células T antiapoptóticas, proliferativas y de larga duración que responden de manera robusta al antígeno para una erradicación completa y sostenida.

El término "receptor de reconocimiento de antígeno" tal como se usa en el presente documento se refiere a un receptor que puede activar una célula inmunitaria (por ejemplo, una célula T) en respuesta a la unión de antígeno. Los receptores de reconocimiento de antígeno a modo de ejemplo pueden ser receptores de células T nativos o endógenos o receptores de antígeno quiméricos en los que un dominio de unión a antígeno tumoral se fusiona a un dominio de señalización intracelular que puede activar una célula inmunitaria (por ejemplo, una célula T). En diversas realizaciones, un receptor de reconocimiento de antígeno se selecciona para tener una afinidad o avidéz baja o mínima por el antígeno.

Por "afinidad" quiere decirse una medida de la fuerza de unión entre anticuerpo y un determinante antigénico o hapteno simple. Sin limitarse a la teoría, la afinidad depende de la proximidad de ajuste estereoquímico entre sitios de combinación de anticuerpo y determinantes antigénicos, del tamaño del área de contacto entre los mismos y de la distribución de grupos cargados e hidrófobos. La afinidad también incluye el término "avidéz", que se refiere a la fuerza de la unión antígeno-anticuerpo tras la formación de complejos reversibles. En la técnica se conocen métodos para calcular la afinidad de un anticuerpo por un antígeno, incluyendo el uso de experimentos de unión para calcular la afinidad. En el caso de un anticuerpo (Ac) que se une a un antígeno (Ag), se usa la constante de afinidad (expresada como la inversa de la constante de disociación).



$$K_a = \frac{[AcAg]}{[Ac][Ag]} = 1/K_d$$

El equilibrio químico de unión de anticuerpo también es la razón de la constante de asociación ( $k_{directa}$ ) y constante de disociación ( $k_{inversa}$ ). Dos anticuerpos pueden tener la misma afinidad, pero uno puede tener una constante tanto de asociación como de disociación altas, mientras que el otro puede tener una constante tanto de asociación como de disociación bajas.

$$K_a = \frac{k_{directa}}{k_{inversa}} = \frac{\text{constante de asociación}}{\text{constante de disociación}}$$

La actividad de anticuerpo en ensayos funcionales (por ejemplo, ensayo de lisis celular) también refleja la afinidad de anticuerpo. El receptor de reconocimiento de antígeno de la célula inmunosensible de la presente invención tiene una baja afinidad en el intervalo de  $K_d$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o más (por ejemplo  $10^{-5}$ ,  $50^{-6}$ ,  $10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-8}$ ,  $10^{-8}$  M). El anticuerpo y las afinidades pueden caracterizarse de manera fenotípica y compararse usando ensayo funcional (por ejemplo, ensayo de lisis celular).

Por "afinidad" quiere decirse una medida de la fuerza de unión entre anticuerpo y un simple. El término "receptor coestimulante quimérico" (CCR), tal como se usa en el presente documento se refiere a un tipo específico de receptor de antígeno quimérico (CAR) que media en la coestimulación independientemente de la activación. Cuando se expresa en células inmunosensibles en combinación con un receptor de reconocimiento de antígeno (por ejemplo, CAR o TCR que activa la célula), el CCR se dirige a un segundo antígeno. En determinadas realizaciones, el CCR tiene una afinidad media o alta por su antígeno diana.

El término "receptor de antígeno quimérico" (CAR) tal como se usa en el presente documento se refiere a un dominio de unión a antígeno tumoral que se fusiona a un dominio de señalización intracelular que puede activar o estimular células T. De la manera más habitual, el dominio de unión extracelular de CAR está compuesto por un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) derivado a partir de la fusión de las regiones pesada y ligera variables de un anticuerpo monoclonal murino o humanizado. Alternativamente, pueden usarse scFv que se derivan a partir de Fab (en lugar de a partir de un anticuerpo, por ejemplo, obtenido a partir de bibliotecas de Fab). En diversas realizaciones,

- este scFv se fusiona a un dominio transmembrana y después a un dominio de señalización intracelular. Los CAR de “primera generación” incluyen aquellos que únicamente proporcionan señales de CD3 tras la unión de antígeno, los CAR de “segunda generación” incluyen aquellos que proporcionan tanto coestimulación (por ejemplo CD28 o CD137) como activación (CD3). Los CAR de “tercera generación” incluyen aquellos que proporcionan coestimulación múltiple (por ejemplo CD28 y CD137) y activación (CD3). En las aplicaciones de CAR hasta ahora, el CAR se selecciona para tener una alta afinidad o avidéz por el antígeno, lo cual es diferente y distinguible de la invención descrita en el presente documento.
- Por “polipéptido de CD3” quiere decirse una proteína que tiene al menos el 85, el 90, el 95, el 96, el 97, el 98, el 99 o el 100% de identidad con respecto al n.º de referencia de NCBI: NP\_932170 o un fragmento de la misma que tiene actividad activante o estimulante. Un CD3 a modo de ejemplo se proporciona en la tabla 1 a continuación. Por “molécula de ácido nucleico de CD3” quiere decirse un polinucleótido que codifica para un polipéptido de CD3.
- Por “polipéptido de CD8” quiere decirse una proteína que tiene al menos el 85, el 90, el 95, el 96, el 97, el 98, el 99 o el 100% de identidad con respecto al n.º de referencia de NCBI: NP\_001759 o un fragmento de la misma que tiene actividad estimulante. Un CD8 a modo de ejemplo se proporciona en la tabla 1 a continuación. Por “molécula de ácido nucleico de CD8” quiere decirse un polinucleótido que codifica para un polipéptido de CD8.
- Por “polipéptido de CD28” quiere decirse una proteína que tiene al menos el 85, el 90, el 95, el 96, el 97, el 98, el 99 o el 100% de identidad con respecto al n.º de referencia de NCBI: NP\_006130 o un fragmento de la misma que tiene actividad estimulante. Un CD28 a modo de ejemplo se proporciona en la tabla 1 a continuación. Por “molécula de ácido nucleico de CD28” quiere decirse un polinucleótido que codifica para un polipéptido de CD28.
- Por “polipéptido de 4-1BB” quiere decirse una proteína que tiene al menos el 85, el 90, el 95, el 96, el 97, el 98, el 99 o el 100% de identidad con respecto al n.º de referencia de NCBI: P41273 o NP\_001552 o un fragmento de la misma que actúa como ligando de factor de necrosis tumoral (TNF). Un 4-1BB a modo de ejemplo se proporciona en la tabla 1 a continuación. Por “molécula de ácido nucleico de 4-1BB” quiere decirse un polinucleótido que codifica para un polipéptido de 4-1BB.
- Por “polipéptido de CD80” quiere decirse una proteína que tiene al menos el 85, el 90, el 95, el 96, el 97, el 98, el 99 o el 100% de identidad con respecto al n.º de referencia de NCBI: NP\_005182 o un fragmento de la misma que actúa como un ligando de la superfamilia de Ig. Un polipéptido de CD80 a modo de ejemplo se proporciona en la tabla 1 a continuación.
- Por “molécula de ácido nucleico de CD80” quiere decirse cualquier polinucleótido que codifica para un polipéptido de CD80. Una molécula de ácido nucleico de CD80 a modo de ejemplo es NM\_005191.
- Por “polipéptido de OX40L” quiere decirse una proteína que tiene al menos el 85, el 90, el 95, el 96, el 97, el 98, el 99 o el 100% de identidad con respecto al n.º de referencia de NCBI: BAB18304 o NP\_003317 o un fragmento de la misma que es un ligando de factor de necrosis tumoral (TNF). Por “molécula de ácido nucleico de OX40L” quiere decirse un polinucleótido que codifica para un polipéptido de OX40L.
- Por “polipéptido de 19z1” quiere decirse una proteína que tiene al menos el 85, el 90, el 95, el 96, el 97, el 98, el 99 o el 100% de identidad con respecto a la secuencia proporcionada a continuación y que tiene actividad activante cuando se une a CD19.
- Por “polipéptido de P28z” quiere decirse una proteína que tiene al menos el 85, el 90, el 95, el 96, el 97, el 98, el 99 o el 100% de identidad con respecto a la secuencia proporcionada a continuación.
- Por “CD19” quiere decirse una proteína que tiene al menos el 85, el 90, el 95, el 96, el 97, el 98, el 99 o el 100% de identidad con respecto a la secuencia proporcionada a continuación y puede unirse a CD19.
- Por “PSMA” quiere decirse una proteína que tiene al menos el 85, el 90, el 95, el 96, el 97, el 98, el 99 o el 100% de identidad con respecto a la secuencia proporcionada a continuación y puede unirse a PSMA.
- Por “P28BB” quiere decirse una proteína que tiene al menos el 85, el 90, el 95, el 96, el 97, el 98, el 99 o el 100% de identidad con respecto a la secuencia proporcionada a continuación y que tiene actividad estimulante cuando se une a PSMA.

60 Tabla 1

SEQ ID NO.	Nombre	
------------	--------	--



ES 2 743 738 T3

1	CD3 $\xi$	mkwkalfataa ilqaqlpите aqsfgllldpk lcyllldgilf iygviltalf lrvkfsrsad apayqqqqnq lynelnlgr eeydvldkrr grdpemggkp qrrknpqegl ynelqkdkma eayseigmkg errrgkghdg lyqglsta tkdtydalhm qalppr
2	CD8	malpvtalll plalllhaar psqfrvspld rtwnlgetve lkcqvllsnp tsgcswlfqp rgaaasptfl lylsqnkpk aegldtqrfs gkrlgdtfvl tldfrrene gyyfcsalsn simyfshfvp vflpakpttt paprpptpap tiasqplslr peacrpaagg avhtrgldfa cdiyiwapla gtcgvllsl vitlycnhrn rrrvckcprp vvksgdkpsl saryv
3	CD28	mlrlllalnl fpsiqvtgnk ilvkqspmlv aydnavnsc kysynlfsre fraslhgld savevcvvyg nysqqlqvys ktgfncdgkl gnesvtfylq nlyvnqtdiy fckievmypp pyldneksng tiihvkghl cpsplfpgps kpfwvlvvg gvlacysllv tvafiiifwvr skrsrllhsd ymnmtprrpg ptrkhyqpya pprdfaayrs
4	4-1BB	mgnscyniva tlllvlnfer trslqpcsn cpagtfcdnn rnqicspcpp nsfssaggqr tcdicrqckg vfrtrkcess tsnaecdctp gfhclgagcs mceqdckggq eltckgckdc cfgtfndqkr gicrpwtncs ldgksvlvng tkerdvvcgp spadlspgas svtpapare pghspqiisf flaltstall flfffltrf svvkrgrkkl lyifkqpfmr pvqttqeedg cscrfeepee ggcel
5	CD80	mghtrrqgts pskcpylnff qllvlaglsh fcsgvihvtk evkevatlsc ghnvsveela qtriywqkek kmvltmmgsd mniwpeyknr tifolditnls ivilalrpsd egtyecvvlk yekdafkreh laevtlsvka dfptpsisdf eiptsnirri icstsggfpe phlswlenge elnainttvs qdpetelyav ssklfdnmtt nhsfmcliky ghlrnqtfn wnttkqehfp dnllpswait lisvngifvi ccltycfapr crerrrnerl rresvrpv
6	OX40L	mervqpleen vgnaarprfe rnklllvasv igglglllcf tyiclhfsal qvshrypriq sikvqfteyk kekgfiltsq kedeimkvqn nsviincdgi ylislkgyfs qevnislhyq kdeepflqk kvrsvnslmv asltykdkvy lnvttntsl ddfhvnggel ilihqnpgef cvl
7	19z1	MALPVTALLLPLALLLHAEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKAS GYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQA TLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSLWYECARKTISSVDFYFDY WGQTTVTVSSGGGSGGGGSGGGSDIELTQSPKFMSTSVGD RVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPD RFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTK LEIKRAAAPTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRVKFSR SAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGQ LSTATKDTYDALHMQUALPPR

8	P28z	MALPVTALLLPLALLLHAEVQLQQSGPELVKPGTSVRI SCKTSGYTF TEYTIHWVKQSHGKSLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSS STAYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNFDYWGQGT TVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSI ICKASQDVGTAVDWYQQKP GQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYF CQQYNSYPLTFGAGTMLDLKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVK GKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKR SRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR
9	CD19	EVKLQQSGAELVRPGSSVKI SCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGLEW IGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVY FCARKTISSVVDYFDYWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSDIEL TQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTINVAWYQQKPGQSPKPLIYSA TYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTS GGGTKLEIKR
10	PSMA	MMALPVTALLLPLALLLHAEVQLQQSGPELVKPGTSVRI SCKTSGYT FTEYTIHWVKQSHGKSLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKS SSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNFDYWGQGT TVTVSSGGGGSGG GGSGGGSDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSI ICKASQDVGTAVDWYQQK PGQSPKLLIYWASTRHTGVPDEF T GSGSGTDFTLTITNVQSEDLADY FCQQYNSYPLTFGAGTMLDLKR
11	P28BB	MALPVTALLLPLALLLHAEVQLQQSGPELVKPGTSVRI SCKTSGYTF TEYTIHWVKQSHGKSLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSS STAYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNFDYWGQGT TVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSI ICKASQDVGTAVDWYQQKP GQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYF CQQYNSYPLTFGAGTMLDLKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVK GKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKR SRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRFSVVKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE

5 Las moléculas de ácido nucleico útiles en los métodos de la invención incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido o un fragmento del mismo dado a conocer en el presente documento. No se necesita que tales moléculas de ácido nucleico sean idénticas al 100% con respecto a una secuencia de nucleótidos endógena, pero normalmente mostrarán una identidad sustancial. Los polinucleótidos que tienen "identidad sustancial" con respecto a una secuencia endógena pueden hibridarse normalmente con al menos una cadena de una molécula de ácido nucleico bicatenaria. Por "hibridarse" quiere decirse emparejarse para formar una molécula bicatenaria entre secuencias de polinucleótido complementarias (por ejemplo, un gen descrito en el presente documento), o partes de las mismas, en diversas condiciones de rigurosidad. (Véase, por ejemplo, Wahl, G. M. y S. L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399; Kimmel, A. R. (1987) Methods Enzymol. 152:507).

15 Por ejemplo, una concentración de sal rigurosa será habitualmente de menos de aproximadamente NaCl 750 mM y citrato de trisodio 75 mM, preferiblemente menos de aproximadamente NaCl 500 mM y citrato de trisodio 50 mM, y más preferiblemente menos de aproximadamente NaCl 250 mM y citrato de trisodio 25 mM. Puede obtenerse hibridación de baja rigurosidad en ausencia de disolvente orgánico, por ejemplo, formamida, mientras que puede obtenerse hibridación de alta rigurosidad en presencia de formamida a al menos aproximadamente el 35%, y más preferiblemente formamida a al menos aproximadamente el 50%. Las condiciones de temperatura rigurosas incluirán habitualmente temperaturas de al menos aproximadamente 30°C, más preferiblemente de al menos aproximadamente 37°C, y lo más preferiblemente de al menos aproximadamente 42°C. Diversos parámetros adicionales, tales como tiempo de hibridación, la concentración de detergente, por ejemplo, dodecilsulfato de sodio (SDS), y la inclusión o exclusión de ADN portador, los conocen bien los expertos en la técnica. Se logran diversos niveles de rigurosidad combinando estas diversas condiciones según se necesite. En una realización preferida, se producirá hibridación a 30°C en NaCl 750 mM, citrato de trisodio 75 mM, y SDS al 1%. En una realización más preferida, se producirá hibridación a 37°C en NaCl 500 mM, citrato de trisodio 50 mM, SDS al 1%, formamida al 35%, y ADN de esperma de salmón desnaturalizado (ADNes) 1001,1 g/m1. En una realización muy preferida, se producirá hibridación a 42°C en NaCl 250 mM, citrato de trisodio 25 mM, SDS al 1%, formamida al 50%, y ADNes 200 pg/ml. Variaciones útiles sobre estas condiciones resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

Para la mayoría de las aplicaciones, etapas de lavado que siguen a la hibridación también variarán en cuanto a la

5 rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad de lavado pueden definirse por la concentración de sal y por la temperatura. Como anteriormente, la rigurosidad de lavado puede aumentarse disminuyendo la concentración de sal o aumentando la temperatura. Por ejemplo, una concentración de sal rigurosa para las etapas de lavado será preferiblemente de menos de aproximadamente NaCl 30 mM y citrato de trisodio 3 mM, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente NaCl 15 mM y citrato de trisodio 1,5 mM. Las condiciones de temperatura rigurosas para las etapas de lavado incluirán habitualmente una temperatura de al menos aproximadamente 25°C, más preferiblemente de al menos aproximadamente 42°C, e incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente 68°C. En una realización preferida, se producirán etapas de lavado a 25°C en NaCl 30 mM, citrato de trisodio 3 mM y SDS al 0,1%. En una realización más preferida, se producirán etapas de lavado a 42°C en NaCl 15 mM, citrato de trisodio 1,5 mM y SDS al 0,1%. En otra realización, se producirán etapas de lavado a 68°C en NaCl 15 mM, citrato de trisodio 1,5 mM y SDS al 0,1%. Variaciones útiles sobre estas condiciones resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

15 Los expertos en la técnica conocen bien técnicas de hibridación y se describen, por ejemplo, en Benton y Davis (Science 196:180, 1977); Grunstein y Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961, 1975); Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, Nueva York, 2001); Berger y Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, Nueva York); y Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

20 Por "sustancialmente idéntico" quiere decirse un polipéptido o molécula de ácido nucleico que muestra al menos el 50% de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos de referencia (por ejemplo, una cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento) o secuencia de nucleótidos (por ejemplo, una cualquiera de las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento). Preferiblemente, una secuencia de este tipo es idéntica en al menos el 60%, más preferiblemente el 80% o el 85%, y más preferiblemente el 90%, el 95% o incluso el 99% a nivel de aminoácido o ácido nucleico con respecto a la secuencia usada para comparación.

30 La identidad de secuencia se mide normalmente usando software de análisis de secuencia (por ejemplo, paquete de software de análisis de secuencia del Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, programas BLAST, BESTFIT, GAP, o PILEUP/PRETTYBOX). Tal software hace coincidir secuencias idénticas o similares asignando grados de homología a diversas sustituciones, deleciones y/u otras modificaciones. Las sustituciones conservativas incluyen normalmente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. En un enfoque a modo de ejemplo para determinar el grado de identidad, puede usarse un programa BLAST, indicando una puntuación de probabilidad de entre e-3 y e-100 una secuencia estrechamente relacionada.

35 Por "análogo" quiere decirse un polipéptido o molécula de ácido nucleico estructuralmente relacionado que tiene la función de un polipéptido o molécula de ácido nucleico de referencia.

40 El término "ligando" tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula que se une a un receptor. En particular, el ligando se une a un receptor en otra célula, permitiendo el reconocimiento entre células.

45 El término "expresión constitutiva" tal como se usa en el presente documento se refiere a la expresión en todas las condiciones fisiológicas.

50 Por "enfermedad" quiere decirse cualquier estado o trastorno que daña o interfiere la función normal de una célula, tejido u órgano. Los ejemplos de enfermedades incluyen neoplasia o infección por patógeno de célula.

55 Por "cantidad eficaz" quiere decirse una cantidad suficiente para detener, mejorar o inhibir la continuación de la proliferación, crecimiento o metástasis (por ejemplo, invasión o migración) de una neoplasia.

60 Por "implementar tolerancia" quiere decirse prevenir la actividad de células autorreactivas o células inmunosensibles que seleccionan como diana tejidos u órganos trasplantados.

65 Por "exógeno" quiere decirse una molécula de ácido nucleico o polipéptido que no está presente de manera endógena en la célula, o no está presente a un nivel suficiente para lograr los efectos funcionales obtenidos cuando se sobreexpresa. Por tanto, el término "exógeno" abarcará cualquier molécula de ácido nucleico o polipéptido recombinante expresado en una célula, tal como moléculas de ácido nucleico y polipéptidos foráneos, heterólogos y sobreexpresados.

Por una "molécula de ácido nucleico o polipéptido heterólogo" quiere decirse una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ADNc, ADN o ARN) o polipéptido que no está normalmente presente en una célula o muestra obtenida a partir de una célula. Este ácido nucleico puede proceder de otro organismo, o puede ser, por ejemplo, una molécula de ARNm que no se expresa normalmente en una célula o muestra.

Por "célula inmunosensible" quiere decirse una célula que funciona en una respuesta inmunitaria o un progenitor o

progenie de la misma.

Por "célula aislada" quiere decirse una célula que está separada de los componentes moleculares y/o celulares que acompañan de manera natural a la célula.

5 Los términos "aislado", "purificado" o "biológicamente puro" se refieren a material que está libre en grados variables de componentes que lo acompañan de manera natural tal como se encuentra en su estado nativo. "Aislar" indica un grado de separación a partir del entorno o la fuente original. "Purificar" indica un grado de separación que es superior al del aislamiento. Una proteína "purificada" o "biológicamente pura" está suficientemente libre de otros materiales de tal manera que cualquier impureza no afecta materialmente a las propiedades biológicas de la proteína o provoca otras consecuencias adversas. Es decir, un ácido nucleico o péptido de esta invención está purificado si está sustancialmente libre de material celular, material viral o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La pureza y la homogeneidad se determinan normalmente usando técnicas de química analítica, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía de líquidos de alta resolución. El término "purificado" puede indicar que un ácido nucleico o proteína da lugar esencialmente a una banda en un gel de electroforesis. Para una proteína que puede someterse a modificaciones, por ejemplo, fosforilación o glicosilación, diferentes modificaciones pueden dar lugar a diferentes proteínas aisladas, que pueden purificarse por separado.

20 El término "dominio de unión a antígeno tumoral" tal como se usa en el presente documento se refiere a un dominio que puede unirse específicamente a un determinante antigénico particular o conjunto de determinantes antigénicos presentes en un tumor.

25 Por "modular" quiere decirse alterar de manera positiva o negativa. Las modulaciones a modo de ejemplo incluyen un cambio del 1%, el 2%, el 5%, el 10%, el 25%, el 50%, el 75% o el 100%.

30 Por "neoplasia" quiere decirse una enfermedad caracterizada por la proliferación patológica de una célula o tejido y su posterior migración a, o invasión de, otros tejidos u órganos. El crecimiento de neoplasia normalmente está descontrolado y es progresivo, y se produce en condiciones que no provocarán, o producirán el cese de, la multiplicación de células normales. Las neoplasias pueden afectar a una variedad de tipos de células, tejidos u órganos, incluyendo, pero sin limitarse a, un órgano seleccionado del grupo que consiste en vejiga, hueso, cerebro, mama, cartílago, glía, esófago, trompa de Falopio, vesícula biliar, corazón, intestinos, riñón, hígado, pulmón, ganglio linfático, tejido nervioso, ovarios, páncreas, próstata, músculo esquelético, piel, médula espinal, bazo, estómago, testículos, timo, glándula tiroidea, tráquea, aparato genitourinario, uréter, uretra, útero y vagina, o un tejido o tipo de célula de los mismos. Las neoplasias incluyen cánceres, tales como sarcomas, carcinomas o plasmacitomas (tumor maligno de las células plasmáticas). Los neoplasmas para los que puede usarse la invención incluyen, pero no se limitan a, leucemias (por ejemplo, leucemia de mama, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia monocítica aguda, eritroleucemia aguda, leucemia crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma (enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin), macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de las cadenas pesadas, y tumores sólidos tales como sarcomas y carcinomas (por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistoadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, cáncer uterino, cáncer de testículos, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, ligodendroglioma, schwannoma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, y retinoblastoma). En una realización, métodos de examen de la invención identifican composiciones que son útiles para tratar cáncer de mama o de pulmón.

55 Por "receptor" quiere decirse un polipéptido, o parte del mismo, presente en una membrana celular que se une de manera selectiva a uno o más ligandos.

Por "reconocer" quiere decirse unirse de manera selectiva a una diana. Una célula T que reconoce un virus expresa normalmente un receptor que se une a un antígeno expresado por el virus.

60 Por "patógeno" quiere decirse un virus, bacteria, hongo, parásito o protozoo que puede provocar enfermedad. Los virus a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, *Retroviridae* (por ejemplo virus de inmunodeficiencia humana, tales como VIH-1 (también denominado HDTV-III, LAVE o HTLV-III/LAV, o VIH-III; y otros aislados, tales como VIH-LP); *Picornaviridae* (por ejemplo poliovirus, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus Coxsackie humanos, rinovirus, echovirus); *Calciviridae* (por ejemplo cepas que provocan gastroenteritis); *Togaviridae* (por ejemplo virus de encefalitis equino, virus de la rubeola); *Flaviridae* (por ejemplo virus del dengue, virus de encefalitis, virus de fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ejemplo coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo virus de estomatitis vesicular, virus de la rabia);

5 *Filoviridae* (por ejemplo virus del Ébola); *Paramyxoviridae* (por ejemplo virus parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo virus de la gripe); *Bungaviridae* (por ejemplo hantavirus, virus de bunta, flebovirus y nairovirus); *Arena Viridae* (virus de la fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (por ejemplo reovirus, orbivirus y rotavirus); *Bimaviridae*; *Hepadnaviridae* (virus de la hepatitis B); *Parvovirida* (parvovirus);  
 10 *Papovaviridae* (virus del papiloma, virus de polio); *Adenoviridae* (la mayoría de los adenovirus); *Herpesviridae* (virus del herpes simple (VHS) 1 y 2, virus varicela-zóster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes); *Poxviridae* (virus de la variola, virus vaccinia, virus de la viruela); e *Iridoviridae* (por ejemplo virus de la fiebre porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo el agente de la hepatitis delta (que se piensa que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de la hepatitis no A, no B (clase 1 = transmitido de manera interna; clase 2 = transmitido de manera parenteral (es decir hepatitis C); virus de Norwalk y relacionados, y astrovirus).

15 Las bacterias a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, *Pasteurella*, *Staphylococci*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, especies de *Pseudomonas* y especies de *Salmonella*. Los ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen, pero no se limitan a, *Helicobacter pylori*, *Borelia burgdoferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria sps* (por ejemplo *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocitogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* de grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* de grupo B), *Streptococcus* (grupo *viridans*), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (especies anaerobias), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter sp.* patógenos, *Enterococcus sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia* y *Actinomyces israeli*.

25 Por “se une específicamente” quiere decirse un polipéptido o fragmento del mismo que reconoce y se une a un polipéptido de interés, pero que no reconoce sustancialmente ni se une a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica, que incluye de manera natural un polipéptido de la invención.

30 El término “antígeno tumoral” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier polipéptido expresado por un tumor que puede inducir una respuesta inmunitaria.

Por “virus antígeno” quiere decirse un polipéptido expresado por un virus que puede inducir una respuesta inmunitaria.

35 Los términos “comprende”, “que comprende” y se pretende que tengan el sentido amplio que se les asigna en la legislación de patentes estadounidense y puede significar “incluye”, “que incluye” y similares.

40 Tal como se usa en el presente documento, “tratamiento” se refiere a la intervención clínica en un intento por alterar el transcurso de la enfermedad del individuo o la célula que está tratándose, y puede realizarse o bien para la profilaxis o bien durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos terapéuticos del tratamiento incluyen, sin limitación, prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o alivio del estado patológico, y remisión o mejora del pronóstico. Al prevenir la progresión de una enfermedad o trastorno, un tratamiento puede prevenir el deterioro debido a un trastorno en un sujeto afectado o diagnosticado o un sujeto que se sospecha que tiene el trastorno, pero además un tratamiento puede prevenir la aparición del trastorno o un síntoma del trastorno en un sujeto en riesgo del trastorno o que se sospecha que tiene el trastorno.

45 El término “sujeto” tal como se usa en el presente documento se refiere a un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano.

50 El término “inmunocomprometido” tal como se usa en el presente documento se refiere a un sujeto que tiene una inmunodeficiencia. El sujeto es muy vulnerable a infecciones oportunistas, infecciones provocadas por organismos que habitualmente no provocan enfermedad en una persona con un sistema inmunitario sano, pero que pueden afectar a personas con un sistema inmunitario suprimido o que funciona mal.

55 En la siguiente divulgación se describen otros aspectos.

60 Se dan a conocer células inmunosensibles genéticamente modificadas (por ejemplo, células T, linfocitos citotóxicos naturales (NK), linfocitos T citotóxicos (CTL)) que expresan al menos una combinación de un receptor de reconocimiento de antígeno (por ejemplo, TCR o CAR) y un receptor coestimulante quimérico (CCR), y métodos de uso de las mismas para el tratamiento de neoplasia y otras patologías en las que se desea un aumento de una respuesta inmunitaria específica de antígeno. La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la implicación simultánea de dos antígenos expresados conjuntamente por una célula tumoral mediante un receptor de reconocimiento de antígeno y receptor coestimulante quimérico es útil para activar y estimular una célula inmunorreactiva sin efectos sistémicos. En particular, la reactividad frente a tejidos que expresan cualquier antígeno solo es preferiblemente mínima, induciendo la activación de células T en presencia de ambos antígenos pero no cualquiera de ellos solos. La activación de células T está mediada por un TCR o un CAR dirigido a un antígeno (por

ejemplo, CD19 o antígeno de células madre de próstata, PSCA). La coestimulación está mediada de manera independiente por un “receptor coestimulante quimérico” (CCR),<sup>12,13</sup> que se dirige a un segundo antígeno (por ejemplo, antígeno de membrana específico de próstata, PSMA). Un enfoque de este tipo dio como resultado una reactividad aumentada frente a tumores positivos para antígeno doble (DP), pero no logró evitar la reactividad potenciada frente a tumores positivos frente a antígeno individual (SP). Se encontró que puede hacerse que células T que detectan tumores distinguan tumores DP de tumores SP mediante atenuación de la activación de células T hasta un nivel en el que la activación de células T es por sí sola ineficaz, pero rescatada funcionalmente en el sitio de tumor mediante un CCR implicado por un antígeno independiente expresado conjuntamente. Este enfoque proporciona inmunogenicidad dentro de microentorno tumoral para la erradicación de tumor al tiempo que no afecta a células SP que son normales o no neoplásicas y representa un avance significativo con respecto a la terapia de células T adoptiva convencional.

Además, este enfoque no se limita al tratamiento de neoplasias, sino que es adecuado para una amplia gama de aplicaciones en las que se desea un aumento de una respuesta inmunitaria específica de antígeno, tales aplicaciones incluyen no sólo el tratamiento de neoplasias, sino también para la potenciación de una respuesta inmunitaria frente a una infección por patógeno o una enfermedad infecciosa y para reforzar la tolerancia inmunitaria en células T reguladoras en el contexto de autoinmunidad o trasplante alogénico.

#### Linajes de células hematopoyéticas

Las células hematopoyéticas (de la sangre) de mamíferos proporcionan una gama diversa de actividades fisiológicas. Las células hematopoyéticas se dividen en linajes linfoide, mieloide y eritroide. El linaje linfoide, que comprende células B, T y linfocitos citolíticos naturales (NK), proporciona la producción de anticuerpos, regulación del sistema inmunitario celular, detección de agentes foráneos en la sangre, detección de células foráneas con respecto al huésped, y similares. El término “células T” tal como se usa en el presente documento se refiere a linfocitos que maduran en el timo y son principalmente responsables de la inmunidad mediada por células. Las células T participan en el sistema inmunitario adaptativo. El término “linfocito citolítico natural (NK)” tal como se usa en el presente documento se refiere a linfocitos que forman parte de la inmunidad mediada por células y actúan durante la respuesta inmunitaria innata. No requieren activación previa para realizar su efecto citotóxico sobre células diana. Las células T citotóxicas (CTL o células T citolíticas) son un subconjunto de linfocitos T que pueden inducir la muerte de células tumorales o somáticas infectadas.

#### Células para su uso en la invención

En el presente documento se dan a conocer células que expresan una combinación de un receptor de reconocimiento de antígeno que activa una célula inmunosensible (por ejemplo, TCR, CAR) y un receptor coestimulante quimérico (CCR), y métodos de uso de tales células para el tratamiento de una enfermedad que requiere una respuesta inmunitaria potenciada. Un aspecto de la presente invención proporciona una célula inmunosensible de la presente invención para su uso en el tratamiento o la prevención de un neoplasma, o la inducción de muerte de células tumorales en un sujeto. En un enfoque, se usan células T específicas de antígeno tumoral, células NK, células CTL u otras células inmunosensibles como lanzaderas para el enriquecimiento selectivo de uno o más ligandos coestimulantes para el tratamiento o la prevención de neoplasia. Por ejemplo, una célula T que expresa un receptor de antígeno quimérico 19z1 que reconoce CD19 se expresa conjuntamente en una célula T que expresa un receptor coestimulante quimérico P28BB que reconoce y se une a antígeno de membrana específico de próstata (PSMA). Tales células son para su administración a un sujeto humano que lo necesita para el tratamiento o la prevención de cáncer de próstata. En otro enfoque, células T específicas de antígeno viral, células NK, células CTL son para su uso en el tratamiento de enfermedades virales. Por ejemplo, un receptor de antígeno coestimulante quimérico que reconoce un primer antígeno de CMV y un receptor de antígeno quimérico que reconoce y se une a un segundo antígeno de CMV se expresan conjuntamente en linfocitos T citotóxicos para el tratamiento de CMV.

#### *Linfocitos T específicos de antígeno tumoral (y células NK)*

Los tipos de linfocitos humanos específicos de antígeno tumoral que pueden usarse en los métodos de la invención incluyen, sin limitación, linfocitos de donante periféricos genéticamente modificados para expresar receptores de antígeno quiméricos (CAR) (Sadelain, M., *et al.* 2003 *Nat Rev Cancer* 3:35-45), linfocitos de donante periféricos genéticamente modificados para expresar un complejo de receptor de células T que reconoce antígeno tumoral de longitud completa que comprende el heterodímero  $\alpha$  y  $\beta$  (Morgan, R.A., *et al.* 2006 *Science* 314:126-129), cultivos de linfocitos derivados de linfocitos de infiltración tumoral (TIL) en biopsias de tumor (Panelli, M.C., *et al.* 2000 *J Immunol* 164:495-504; Panelli, M.C., *et al.* 2000 *J Immunol* 164:4382-4392), y leucocitos de sangre periférica específicos de antígeno expandidos *in vitro* de manera selectiva que emplean células presentadoras de antígenos artificiales (AAPC) o células dendríticas pulsadas (Dupont, J., *et al.* 2005 *Cancer Res* 65: 5417-5427; Papanicolaou, G.A., *et al.* 2003 *Blood* 102:2498-2505). Las células T pueden ser autólogas, alogénicas o derivadas *in vitro* a partir de células madre o progenitoras modificadas por ingeniería.

Cualquier antígeno tumoral adecuado (péptido antigénico) es adecuado para su uso en las realizaciones relacionadas con tumor descritas en el presente documento. Las fuentes de antígeno incluyen, pero no se limitan a, proteínas cancerosas. El antígeno puede expresarse como un péptido o como una proteína intacta o parte de la misma. La

proteína intacta o parte de la misma puede ser nativa o estar mutagenizada. Los antígenos adecuados incluyen antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) y antígeno de células madre de próstata (PCSA).

*Linfocitos T específicos de antígeno viral (y células NK)*

5 Los antígenos adecuados para su uso en el tratamiento de infección por patógeno u otra enfermedad infecciosa, por ejemplo, en un sujeto inmunocomprometido, incluyen, sin limitación, antígenos virales presentes en citomegalovirus (CMV), virus de Epstein Barr (VEB), virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y virus de la gripe.

10 La fuente sin purificar de CTL puede ser cualquiera conocida en la técnica, tal como la médula ósea, fetal, de neonato o de adulto u otra fuente de células hematopoyéticas, por ejemplo, hígado fetal, sangre periférica o sangre de cordón umbilical. Pueden emplearse diversas técnicas para separar las células. Por ejemplo, métodos de selección negativa pueden retirar inicialmente células distintas de CTL. Los AcM son particularmente útiles para identificar marcadores asociados con linajes celulares particulares y/o estadios de diferenciación para selecciones tanto positivas como  
15 negativas.

Una gran proporción de células diferenciadas de manera terminal pueden eliminarse inicialmente mediante una separación relativamente basta. Por ejemplo, pueden usarse inicialmente separaciones de perlas magnéticas para retirar grandes números de células irrelevantes. Preferiblemente, al menos aproximadamente el 80%, habitualmente  
20 al menos el 70% de las células hematopoyéticas totales se retirarán antes del aislamiento celular.

Los procedimientos para la separación incluyen, pero no se limitan a, centrifugación en gradiente de densidad; nueva sedimentación; acoplamiento a partículas que modifican la densidad celular; separación magnética con perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo; cromatografía de afinidad; agentes citotóxicos unidos a, o usados junto con,  
25 un AcM, incluyendo, pero sin limitarse a, complemento y citotoxinas; y adsorción con anticuerpo unido a una matriz sólida, por ejemplo placa, chip, elutriación o cualquier otra técnica conveniente.

Las técnicas para la separación y el análisis incluyen, pero no se limitan a, citometría de flujo, que puede tener diversos grados de sofisticación, por ejemplo, una pluralidad de canales de color, canales de detección de dispersión de la luz obtusa y de ángulo bajo, canales de impedancia.  
30

Las células pueden seleccionarse frente a células muertas empleando colorantes asociados con células muertas tales como yoduro de propidio (PI). Preferiblemente, las células se recogen en un medio que comprende suero de ternero fetal al 2% (FCS) o albúmina sérica bovina al 0,2% (BSA) o cualquier otro medio isotónico adecuado, preferiblemente  
35 estéril.

Por consiguiente, se da a conocer una célula inmunosensible, tal como una célula T específica de virus o específica de tumor que comprende un receptor que se une a un primer antígeno y activa la célula inmunosensible y un receptor que se une a un segundo antígeno y estimula la célula inmunosensible.  
40

Vectores

La modificación genética de células inmunosensibles (por ejemplo, células T, células CTL, células NK) puede lograrse transduciendo una composición de células sustancialmente homogénea con un constructo de ADN recombinante.  
45 Preferiblemente, se emplea un vector retroviral (o bien gamma-retroviral o bien lentiviral) para la introducción del constructo de ADN al interior de la célula. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica para un receptor que se une a un antígeno (por ejemplo, un antígeno tumoral, o una variante, o un fragmento del mismo), puede clonarse en un vector retroviral y puede impulsarse la expresión a partir de su promotor endógeno, a partir de la repetición terminal larga retroviral, o a partir de un promotor específico para un tipo de célula diana de interés. También pueden usarse  
50 vectores no virales.

Para la modificación genética inicial de las células para proporcionar células específicas de antígeno tumoral o viral, generalmente se emplea un vector retroviral para la transducción, sin embargo puede usarse cualquier otro sistema de administración no viral o de vector viral adecuado. Para la posterior modificación genética de las células para proporcionar células que comprenden un complejo de presentación de antígeno que comprende al menos dos ligandos coestimulantes, la transferencia génica retroviral (transducción) también demuestra ser eficaz. También son adecuadas combinaciones de vector retroviral y una línea de empaquetado apropiada, en las que las proteínas de la cápside serán funcionales para infectar células humanas. Se conocen diversas líneas celulares productoras de virus anfitriónicos, incluyendo, pero sin limitarse a, PA12 (Miller, *et al.* (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437); PA317 (Miller, *et al.* (1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902); y CRIP (Danos, *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464). Las partículas no anfitriónicas también son adecuadas, por ejemplo, partículas seudotipadas con envuelta VSVG, RD114 o GALV y cualquier otra conocida en la técnica.  
55  
60

Los métodos de transducción posibles también incluyen cultivo conjunto directo de las células con células productoras, por ejemplo, mediante el método de Bregni, *et al.* (1992) Blood 80:1418-1422, o cultivo con sobrenadante viral solo o disoluciones madre de vector concentradas con o sin factores de crecimiento apropiados y policaciones, por ejemplo,  
65

mediante el método de Xu, *et al.* (1994) Exp. Hemat. 22:223-230; y Hughes, *et al.* (1992) J. Clin. Invest. 89:1817.

Pueden usarse otros vectores virales de transducción para expresar un ligando coestimulante de la invención en una célula inmunosensible. Preferiblemente, el vector elegido muestra alta eficiencia de infección e integración y expresión estables (véase, por ejemplo, Cayouette *et al.*, Human Gene Therapy 8:423-430, 1997; Kido *et al.*, Current Eye Research 15:833-844, 1996; Bloomer *et al.*, Journal of Virology 71:6641-6649, 1997; Naldini *et al.*, Science 272:263-267, 1996; y Miyoshi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:10319, 1997). Otros vectores virales que pueden usarse incluyen, por ejemplo, vectores adenovirales, lentivirales y virales adenoasociados, virus vaccinia, un virus de papiloma bovino, o un virus de herpes, tal como virus de Epstein-Barr (véase también, por ejemplo, los vectores de Miller, Human Gene Therapy 15-14, 1990; Friedman, Science 244:1275-1281, 1989; Eglitis *et al.*, BioTechniques 6:608-614, 1988; Tolstoshev *et al.*, Current Opinion in Biotechnology 1:55-61, 1990; Sharp, The Lancet 337:1277-1278, 1991; Cornetta *et al.*, Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-322, 1987; Anderson, Science 226:401-409, 1984; Moen, Blood Cells 17:407-416, 1991; Miller *et al.*, Biotechnology 7:980-990, 1989; Le Gal La Salle *et al.*, Science 259:988-990, 1993; y Johnson, Chest 107:77S-83S, 1995). Los vectores retrovirales están particularmente bien desarrollados y se han usado en entornos clínicos (Rosenberg *et al.*, N. Engl. J. Med 323:370, 1990; Anderson *et al.*, patente estadounidense n.º 5.399.346).

También pueden emplearse enfoques no virales para la expresión de una proteína en célula. Por ejemplo, puede introducirse una molécula de ácido nucleico en una célula administrando el ácido nucleico en presencia de lipofección (Feigner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413, 1987; Ono *et al.*, Neuroscience Letters 17:259, 1990; Brigham *et al.*, Am. J. Med. Sci. 298:278, 1989; Staubinger *et al.*, Methods in Enzymology 101:512, 1983), conjugación de asialoorosomucoide-pollisina (Wu *et al.*, Journal of Biological Chemistry 263: 14621, 1988; Wu *et al.*, Journal of Biological Chemistry 264:16985, 1989), o mediante microinyección en condiciones quirúrgicas (Wolff *et al.*, Science 247:1465, 1990).

Otros medios no virales para la transferencia génica incluyen transfección *in vitro* usando fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación y fusión de protoplastos. Los liposomas también pueden ser posiblemente beneficiosos para la administración de ADN al interior de una célula. El trasplante de genes normales al interior de los tejidos afectados de un sujeto también puede lograrse mediante transferencia de un ácido nucleico normal al interior de un tipo de célula cultivable *ex vivo* (por ejemplo, una célula primaria autóloga o heteróloga o progenie de la misma), tras lo cual se inyecta la célula (o sus descendientes) al interior de un tejido seleccionado como diana o se inyecta de manera sistémica. También pueden derivarse u obtenerse receptores recombinantes usando transposasas o nucleasas dirigidas (por ejemplo nucleasas con dedos de cinc, meganucleasas, o nucleasas TALE). Puede obtenerse expresión transitoria mediante electroporación de ARN. La expresión de ADNc para su uso en métodos de terapia de polinucleótidos puede dirigirse a partir de cualquier promotor adecuado (por ejemplo, los promotores de citomegalovirus (CMV) humano, virus de simio 40 (SV40), o metalotioneína), y regularse mediante cualquier elemento regulador de mamífero apropiado o intrón (por ejemplo, la estructura de potenciador/promotor/intrón de factor de elongación 1c). Por ejemplo, si se desea, potenciadores que se sabe que dirigen preferiblemente la expresión génica en tipos de células específicos pueden usarse para dirigir la expresión de un ácido nucleico. Los potenciadores usados pueden incluir, sin limitación, aquellos que se caracterizan como potenciadores específicos de tejido o de célula. Alternativamente, si se usa un clon genómico como constructo terapéutico, la regulación puede medirse por las secuencias reguladoras relacionadas o, si se desea, por secuencias reguladoras derivadas de una fuente heteróloga, incluyendo cualquiera de los promotores o elementos reguladores anteriormente descritos.

Las células resultantes pueden hacerse crecer entonces en condiciones similares a las de células no modificadas, mediante lo cual las células modificadas pueden expandirse y usarse para una variedad de fines.

También se dan a conocer en el presente documento polipéptidos de 19z1, CD19, CD8, CD3, dsRed, P28BB, PSMA, CD28, 4-1 BB, GFP o fragmentos de los mismos que se modifican de maneras que potencian su actividad antineoplásica cuando se expresan en una célula inmunosensible. La invención proporciona métodos para optimizar una secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos produciendo una alteración en la secuencia. Tales alteraciones pueden incluir determinadas mutaciones, deleciones, inserciones o modificaciones postraduccionales. La invención incluye además análogos de cualquier polipéptido que se produce de manera natural de la invención. Los análogos pueden diferir de un polipéptido que se produce de manera natural de la invención mediante diferencias en la secuencia de aminoácidos, mediante modificaciones postraduccionales, o mediante ambas. Los análogos de la invención mostrarán generalmente al menos el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más de identidad con la totalidad o parte de una secuencia de aminoácidos que se produce de manera natural de la invención. La longitud de la comparación de secuencia es de al menos 5, 10, 15 o 20 residuos de aminoácido, preferiblemente al menos 25, 50 o 75 residuos de aminoácido, y más preferiblemente más de 100 residuos de aminoácido. De nuevo, en un enfoque a modo de ejemplo para determinar el grado de identidad, puede usarse un programa BLAST, indicando una puntuación de probabilidad de entre  $e^3$  y  $e^{-100}$  una secuencia estrechamente relacionada. Las modificaciones incluyen derivatización química *in vivo* e *in vitro* de polipéptidos, por ejemplo, acetilación, carboxilación, fosforilación o glicosilación; tales modificaciones pueden producirse durante la síntesis o el procesamiento de polipéptidos o tras el tratamiento con enzimas de modificación aisladas. Los análogos también pueden diferir de los polipéptidos que se producen de manera natural de la invención mediante alteraciones en la secuencia primaria. Estas incluyen variantes genéticas, tanto naturales como inducidas (por ejemplo, resultantes



de mutagénesis al azar mediante irradiación o exposición a etanometilsulfato o mediante mutagénesis específica del sitio tal como se describe en Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed.), CSH Press, 1989, o Ausubel *et al.*, citado anteriormente). También se incluyen péptidos, moléculas y análogos ciclizados que contienen residuos distintos de L-aminoácidos, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos o que no se producen de manera natural, por ejemplo, - o - aminoácidos.

Además de polipéptidos de longitud completa, también se dan a conocer fragmentos de uno cualquiera de los polipéptidos o dominios de péptido de la invención. Tal como se usa en el presente documento, el término "un fragmento" significa al menos 5, 10, 13 o 15 aminoácidos. En otros ejemplos un fragmento es de al menos 20 aminoácidos contiguos, al menos 30 aminoácidos contiguos o al menos 50 aminoácidos contiguos, y en otras realizaciones al menos de 60 a 80, 100, 200, 300 o más aminoácidos contiguos. Los fragmentos de la invención pueden generarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica o pueden resultar del procesamiento de proteínas normal (por ejemplo, retirada de aminoácidos a partir del polipéptido naciente que no se requieren para la actividad biológica o retirada de aminoácidos mediante corte y empalme de ARNm alternativo o acontecimientos de procesamiento de proteínas alternativos).

Los análogos distintos de proteínas tienen una estructura química diseñada para imitar la actividad funcional de una proteína de la invención. Tales análogos se administran según métodos de la invención. Tales análogos pueden superar la actividad fisiológica del polipéptido original. En la técnica se conocen bien métodos de diseño de análogos y la síntesis de análogos puede llevarse a cabo según tales métodos modificando las estructuras químicas de tal manera que los análogos resultantes aumentan la actividad antineoplásica del polipéptido original cuando se expresan en una célula inmunosensible. Estas modificaciones químicas incluyen, pero no se limitan a, sustitución con grupos R alternativos y variación del grado de saturación en átomos de carbono específicos de un polipéptido de referencia. Preferiblemente, los análogos de proteínas son relativamente resistentes a la degradación *in vivo*, dando como resultado un efecto terapéutico más prolongado tras la administración. Los ensayos para medir la actividad funcional incluyen, pero no se limitan a, los descritos en los ejemplos más adelante.

#### Ligandos coestimulantes

La interacción con al menos un ligando coestimulante proporciona una señal no específica de antígeno importante para la activación completa de una célula inmunitaria (por ejemplo, célula T). Los ligandos coestimulantes incluyen, sin limitación, ligandos de factor de necrosis tumoral (TNF), citocinas (tales como IL-2, IL-12, IL-15 o IL21), y ligandos de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig).

El factor de necrosis tumoral (TNF) es una citocina que participa en la inflamación sistémica y estimula la reacción de fase aguda. Su papel principal está en la regulación de células inmunitarias. Los ligandos de factor de necrosis tumoral (TNF) comparten varias características comunes. La mayoría de los ligandos se sintetizan como proteínas transmembrana de tipo II (extremo C-terminal extracelular) que contienen un segmento citoplasmático corto y una región extracelular relativamente larga. Los ligandos de TNF incluyen, sin limitación, factor de crecimiento nervioso (NGF), CD4OL (CD4OL)/CD154, CD137L/4-1BBL, factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), CD134L/OX4OL/CD252, CD27L/CD70, ligando Fas (FasL), CD3OL/CD153, factor de necrosis tumoral beta (TNF(3)/linfotóxina alfa (LT $\alpha$ ), linfotóxina beta (ur(3), CD257/factor de activación de células B (BAFF)/Blys/THANK/Ta11-1, ligando de receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITRL), y ligando de inducción de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), LIGHT (TNFSF14). La superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) es un gran grupo de proteínas solubles y de superficie celular que participan en los procesos de reconocimiento, unión o adhesión de células. Estas proteínas comparten características estructurales con las inmunoglobulinas, presentan un dominio de inmunoglobulina (pliegue). Los ligandos de la superfamilia de inmunoglobulinas incluyen, sin limitación, CD80 y CD86, ambos ligandos para CD28.

Las composiciones que comprenden células inmunosensibles genéticamente modificadas de la invención (por ejemplo, células T, células NK, células CTL, o sus progenitores) pueden ser para su administración sistémica o directa a un sujeto para el tratamiento de una neoplasia, infección por patógeno o enfermedad infecciosa. En una realización, las células de la invención son para su administración inyectadas directamente al interior de un órgano de interés (por ejemplo, un órgano afectado por una neoplasia). Alternativamente, las composiciones que comprenden células inmunosensibles genéticamente modificadas son para su administración indirecta al órgano de interés, por ejemplo, mediante administración al interior del sistema circulatorio (por ejemplo, la vasculatura tumoral). Pueden proporcionarse agentes de expansión y diferenciación antes, durante o después de la administración de las células para aumentar la producción de células T, células NK o células CTL *in vitro* o *in vivo*.

Las células modificadas pueden ser para su administración en cualquier vehículo fisiológicamente aceptable, normalmente por vía intravascular, aunque también pueden introducirse al interior del hueso u otro sitio conveniente en el que las células pueden encontrar un sitio apropiado para la regeneración y diferenciación (por ejemplo, el timo). Habitualmente, se administrarán al menos  $1 \times 10^5$  células, alcanzando eventualmente o más. Las células inmunosensibles genéticamente modificadas de la invención pueden comprender una población purificada de células. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente el porcentaje de células inmunosensibles genéticamente modificadas en una población usando diversos métodos bien conocidos, tales como clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Intervalos preferibles de pureza en poblaciones que comprenden células inmunosensibles

genéticamente modificadas son de aproximadamente el 50 a aproximadamente el 55%, de aproximadamente el 55 a aproximadamente el 60%, y de aproximadamente el 65 a aproximadamente el 70%. Más preferiblemente la pureza es de aproximadamente el 70 a aproximadamente el 75%, de aproximadamente el 75 a aproximadamente el 80%, de aproximadamente el 80 a aproximadamente el 85%; y todavía más preferiblemente la pureza es de aproximadamente el 85 a aproximadamente el 90%, de aproximadamente el 90 a aproximadamente el 95%, y de aproximadamente el 95 a aproximadamente el 100%. Las dosificaciones pueden ajustarse fácilmente por los expertos en la técnica (por ejemplo, una disminución de la pureza puede requerir un aumento de la dosificación). Las células pueden ser para su administración mediante inyección, catéter o similar. Si se desea, también pueden incluirse factores, incluyendo, pero sin limitarse a, interleucinas, por ejemplo IL-2, IL-3, IL-6 e IL-11, así como las demás interleucinas, los factores estimulantes de colonias, tales como G, M y GM-CSF, interferones, por ejemplo interferón gamma, y eritropoyetina.

Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen composiciones farmacéuticas que comprenden células inmunosensibles genéticamente modificadas o sus progenitores y un portador farmacéuticamente aceptable. La administración puede ser autóloga o heteróloga. Por ejemplo, pueden obtenerse células inmunosensibles, o progenitores, a partir de un sujeto, y administrarse al mismo sujeto o a un sujeto diferente compatible. Células inmunosensibles derivadas de sangre periférica de la invención o su progenie (por ejemplo, derivadas *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*) pueden administrarse mediante inyección localizada, incluyendo administración por catéter, inyección sistémica, inyección localizada, inyección intravenosa o administración parenteral. La composición farmacéutica de la presente invención puede formularse generalmente para su administración en una forma inyectable de dosificación unitaria (disolución, suspensión, emulsión).

#### Formulaciones

Las composiciones dadas a conocer que comprenden células inmunosensibles genéticamente modificadas pueden proporcionarse convenientemente como preparaciones líquidas estériles, por ejemplo, disoluciones acuosas isotónicas, suspensiones, emulsiones, dispersiones o composiciones viscosas, que pueden tamponarse a un pH seleccionado. Las preparaciones líquidas son normalmente más fáciles de preparar que los geles, otras composiciones viscosas y composiciones sólidas. Adicionalmente, las composiciones líquidas son algo más convenientes de administrar, especialmente mediante inyección. Por otro lado, las composiciones viscosas pueden formularse dentro del intervalo de viscosidad apropiado para proporcionar periodos de contacto más prolongados con tejidos específicos. Las composiciones líquidas o viscosas pueden comprender portadores, que pueden ser un disolvente o medio dispersante que contiene, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos.

Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando las células inmunosensibles genéticamente modificadas usadas en la práctica de la presente invención en la cantidad requerida del disolvente apropiado con diversas cantidades de los demás componentes, según se desee. Tales composiciones pueden estar en mezcla con un portador, diluyente o excipiente adecuado tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa, dextrosa o similares. Las composiciones también pueden liofilizarse. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes, dispersantes o emulsionantes (por ejemplo, metilcelulosa), agentes tamponantes del pH, aditivos gelificantes o potenciadores de la viscosidad, conservantes, agentes aromatizantes, colores y similares, dependiendo de la vía de administración y la preparación deseada. Pueden consultarse textos convencionales, tales como "REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17ª edición, 1985, para preparar preparaciones adecuadas, sin experimentación excesiva.

Pueden añadirse diversos aditivos que pueden potenciar la estabilidad y esterilidad de las composiciones, incluyendo conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. La prevención de la acción de microorganismos puede garantizarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede producirse mediante el uso de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Sin embargo, según la presente invención cualquier vehículo, diluyente o aditivo usado tendrá que ser compatible con las células inmunosensibles genéticamente modificadas o sus progenitores.

Las composiciones pueden ser isotónicas, es decir, pueden tener la misma presión osmótica que la sangre y el líquido lacrimonal. La isotonicidad deseada de las composiciones dadas a conocer en el presente documento puede lograrse usando cloruro de sodio, u otros agentes farmacéuticamente aceptables tales como dextrosa, ácido bórico, tartrato de sodio, propilenglicol u otros solutos inorgánicos u orgánicos. Se prefiere particularmente cloruro de sodio para tampones que contienen iones de sodio.

La viscosidad de las composiciones, si se desea, puede mantenerse al nivel seleccionado usando un agente espesante farmacéuticamente aceptable. Se prefiere metilcelulosa porque está disponible de manera fácil y económica y es fácil de manipular. Otros agentes espesantes adecuados incluyen, por ejemplo, goma xantana, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carbómero y similares. La concentración preferida del espesante dependerá del agente seleccionado. El punto importante es usar una cantidad que logre la viscosidad seleccionada. Evidentemente, la elección de portadores adecuados y otros aditivos dependerá de la vía de administración exacta y de la naturaleza de la forma de dosificación particular, por ejemplo, forma de dosificación líquida (por ejemplo, si la

composición va a formularse para dar una disolución, una suspensión, gel u otra forma líquida, tal como una forma de liberación a lo largo del tiempo o forma con relleno líquido).

Los expertos en la técnica reconocerán que los componentes de las composiciones deben seleccionarse para ser químicamente inertes y no afectarán a la viabilidad o eficacia de las células inmunosensibles genéticamente modificadas tal como se describen en la presente invención. Esto no presentará ningún problema para los expertos en principios químicos y farmacéuticos, o los problemas pueden evitarse fácilmente haciendo referencia a textos convencionales o mediante experimentos sencillos (que no implican experimentación excesiva), a partir de esta divulgación y los documentos citados en el presente documento. Una consideración referente al uso terapéutico de células inmunosensibles genéticamente modificadas de la invención es la cantidad de células necesarias para lograr un efecto óptimo. La cantidad de células que van a administrarse variará para el sujeto que está tratándose. En una realización, entre  $10^4$  y  $10^{10}$ , entre  $10^5$  y  $10^9$ , o entre  $10^6$  y  $10^8$  células inmunosensibles genéticamente modificadas de la invención son para su administración a un sujeto humano. Pueden proporcionarse células más eficaces para su administración en números incluso menores. En algunas realizaciones, se proporcionan al menos aproximadamente  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^8$  y  $5 \times 10^8$  células inmunosensibles genéticamente modificadas de la invención para su administración a un sujeto humano. La determinación precisa de lo que se considerará una dosis eficaz puede basarse en factores individuales para cada sujeto, incluyendo su tamaño, edad, sexo, peso y estado del sujeto particular. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente las dosificaciones a partir de esta divulgación y del conocimiento en la técnica.

El experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad de células y aditivos, vehículos y/o portador opcional en composiciones para su administración. Normalmente, cualquier aditivo (además de la(s) célula(s) activa(s) y/o agente(s)) está presente en una cantidad disolución en solución salina tamponada con fosfato del 0,001 al 50% (en peso), y el principio activo está presente en el orden de microgramos a miligramos, tal como de aproximadamente el 0,0001 a aproximadamente el 5% en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,0001 a aproximadamente el 1% en peso, todavía más preferiblemente de aproximadamente el 0,0001 a aproximadamente el 0,05% en peso o de aproximadamente el 0,001 a aproximadamente el 20% en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 10% en peso, y todavía más preferiblemente de aproximadamente el 0,05 a aproximadamente el 5% en peso. Evidentemente, para cualquier composición que va a administrarse a un animal o ser humano, y para cualquier método de administración particular, se prefiere determinar por tanto: la toxicidad, tal como mediante determinación de la dosis letal (DL) y DL50 en un modelo de animal adecuado, por ejemplo, roedor tal como ratón; y, la dosificación de la(s) composición/composiciones, la concentración de componentes en la(s) misma(s) y el momento de administración de la(s) composición/composiciones, que puede provocar una respuesta adecuada. Tales determinaciones no requieren experimentación excesiva a partir del conocimiento del experto en la técnica, esta divulgación y los documentos citados en el presente documento. Y el momento para administraciones secuenciales puede determinarse sin experimentación excesiva.

#### Usos médicos

En el presente documento se dan a conocer métodos para tratar neoplasia en un sujeto. También se contemplan en el presente documento métodos para tratar una infección por patógeno u otra enfermedad infecciosa en un sujeto, tal como un sujeto humano inmunocomprometido. Los métodos comprenden administrar una célula T, célula NK o célula CTL de la invención en una cantidad eficaz para lograr el efecto deseado, ya sea alivio de un estado existente o prevención de recidiva. Para el tratamiento, la cantidad administrada es una cantidad eficaz en la producción del efecto deseado. Una cantidad eficaz puede proporcionarse en una o en una serie de administraciones. Una cantidad eficaz puede proporcionarse en un bolo o mediante perfusión continua.

Una "cantidad eficaz" (o, "cantidad terapéuticamente eficaz") es una cantidad suficiente para producir un resultado clínico beneficioso o deseado tras el tratamiento. Una cantidad eficaz puede administrarse a un sujeto en una o más dosis. En cuanto al tratamiento, una cantidad eficaz es una cantidad que es suficiente para aliviar, mejorar, estabilizar, revertir o ralentizar la progresión de la enfermedad, o reducir de otro modo las consecuencias patológicas de la enfermedad. La cantidad eficaz se determina generalmente por el médico para cada caso y está dentro de las habilidades de un experto en la técnica. Normalmente se tienen en cuenta varios factores cuando se determina una dosificación apropiada para lograr una cantidad eficaz. Estos factores incluyen edad, sexo y peso del sujeto, el estado que está tratándose, la gravedad del estado y la forma y concentración eficaz del fragmento de unión a antígeno administrado.

Para inmunoterapia adoptiva usando células T específicas de antígeno, normalmente se aplican por infusión dosis de célula en el intervalo de  $10^6$  -  $10^{10}$  (por ejemplo,  $10^9$ ). Tras la administración de las células genéticamente modificadas al interior del huésped y posterior diferenciación, se inducen células T que van dirigidas específicamente contra el antígeno específico. La "inducción" de células T puede incluir inactivación de células T específicas de antígeno tal como mediante deleción o anergia. La inactivación es particularmente útil para establecer o volver a establecer tolerancia tal como en trastornos autoinmunitarios. Las células modificadas pueden administrarse mediante cualquier método conocido en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, intravenoso, subcutáneo, intranodal, intratumoral, intratecal, intrapleurar, intraperitoneal y directamente al timo.

Se dan a conocer métodos para aumentar una respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesita. Por ejemplo, métodos para tratar o prevenir una neoplasia en un sujeto. Se dan a conocer terapias que son particularmente útiles para el tratamiento de sujetos que tienen cáncer de próstata, o cáncer de próstata metastásico que no puede someterse a intervenciones terapéuticas convencionales. Los sujetos humanos adecuados para terapia comprenden normalmente dos grupos de tratamiento que pueden distinguirse mediante criterios clínicos. Los sujetos con "enfermedad avanzada" o "alta carga tumoral" son aquellos que portan un tumor clínicamente medible. Un tumor clínicamente medible es uno que puede detectarse basándose en la masa tumoral (por ejemplo, mediante palpación, exploración TAC, sonograma, mamograma o rayos X; marcadores histopatológicos o bioquímicos positivos por sí solos son insuficientes para identificar a esta población). Una composición farmacéutica implementada en esta invención es para su administración a estos sujetos para provocar una respuesta antitumoral, con el objetivo de aliviar su estado. De manera ideal, se produce como resultado reducción de la masa tumoral, pero cualquier mejora clínica constituye un beneficio. La mejora clínica incluye reducción del riesgo o la tasa de progresión o reducción de las consecuencias patológicas del tumor.

Un segundo grupo de sujetos adecuados se conoce en la técnica como "grupo adyuvante". Se trata de individuos que han tenido una historia de neoplasia, pero han respondido a otro modo de terapia. La terapia anterior puede haber incluido, pero no se limita a, resección quirúrgica, radioterapia y quimioterapia tradicional. Como resultado, estos individuos no tienen ningún tumor clínicamente medible. Sin embargo, se sospecha que corren el riesgo de progresión de la enfermedad, o bien cerca del sitio de tumor original o bien mediante metástasis. Este grupo puede subdividirse adicionalmente en individuos de riesgo alto y de riesgo bajo. La subdivisión se realiza basándose en características observadas antes o después del tratamiento inicial. Estas características se conocen en las técnicas clínicas y se definen de manera adecuada para cada neoplasia diferente. Las características típicas de los subgrupos de alto riesgo son aquellas en las que el tumor ha invadido tejidos circundantes, o que muestran implicación de ganglios linfáticos.

Otro grupo tienen una predisposición genética a la neoplasia pero aún no han mostrado evidencias de signos clínicos de neoplasia. Por ejemplo, las mujeres con resultados positivos en pruebas para detectar una mutación genética asociada con cáncer de mama, pero que todavía están en edad de procrear, pueden desear recibir uno o más de los fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento en el tratamiento de manera profiláctica para prevenir la aparición de neoplasia hasta que sea adecuado realizar una cirugía preventiva.

Los sujetos humanos con neoplasia que tienen cualquiera de las siguientes neoplasias: glioblastoma, melanoma, neuroblastoma, adenocarcinoma, glioma, sarcoma de tejido blando y diversos carcinomas (incluyendo cáncer de próstata y de pulmón de células pequeñas) son sujetos especialmente apropiados. Los carcinomas adecuados incluyen además cualquiera conocido en el campo de la oncología, incluyendo, pero sin limitarse a, astrocitoma, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, oligodendroglioma, ependimoma, meduloblastoma, tumor ectodérmico neuronal primitivo (PNET), condrosarcoma, sarcoma osteogénico, adenocarcinoma de conductos pancreáticos, adenocarcinomas de pulmón de células pequeñas y grandes, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, carcinoma de células escamosas, carcinomabroncoalveolar, adenocarcinoma epitelial, y metástasis de hígado de los mismos, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, hepatoma, colangiocarcinoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, carcinoma de células basales, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma papilar, carcinoma de glándula sebácea, adenocarcinoma papilar, cistoadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, carcinoma de conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, tumor de testículos, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemia, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, y enfermedad de las cadenas pesadas, tumores de mama tales como adenocarcinoma ductal y lobular, adenocarcinomas escamosos y del cuello uterino, carcinomas epiteliales de ovarios y uterinos, adenocarcinomas de próstata, carcinoma de células escamosas transicionales de la vejiga, linfomas de células B y T (nodulares y difusos) plasmacitoma, leucemias agudas y crónicas, melanoma maligno, sarcomas de tejido blando y leiomiomas.

Los sujetos pueden tener una forma avanzada de la enfermedad, en cuyo caso el objetivo de tratamiento puede incluir la mitigación o reversión de la progresión de la enfermedad y/o mejora de los efectos secundarios. Los sujetos pueden tener una historia del estado, para el que ya se han tratado, en cuyo caso el objetivo terapéutico incluirá normalmente una disminución o retardo del riesgo de recidiva.

Por consiguiente, la invención proporciona una célula inmunosensible de la presente invención para su uso en el tratamiento o la prevención de un neoplasma, o la inducción de muerte de células tumorales en un sujeto, en la que la célula inmunosensible de la presente invención puede ser para la administración en una cantidad eficaz de una célula inmunosensible que comprende un receptor que se une a un antígeno tumoral y activa la célula inmunosensible (por ejemplo, TCR, CAR) y un vector que codifica para un receptor que se une a otro antígeno tumoral y estimula la célula inmunosensible. En una realización, la neoplasia se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de mama, cánceres de la sangre (por ejemplo leucemias, linfomas y mielomas), cáncer de ovarios, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de colon, cáncer intestinal, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de la piel, cáncer de estómago, glioblastoma y cáncer de garganta. En otra realización, el antígeno tumoral es uno o más de anhidrasa carbónica IX (CAIX), antígeno carcinoembrionario (CEA), CD5, CD?, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD133, CD138, un

antígeno de una célula infectada por citomegalovirus (CMV) (por ejemplo, un antígeno de superficie celular), glicoproteína epitelial 2 (EGP-2), glicoproteína epitelial 40 (EGP-40), molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), tirosina-proteína receptora cinasas erb-B2,3,4, proteína de unión a folato (FBP), receptor de acetilcolina fetal (AChR), receptor de folato-a, gangliósido G2 (GD2), gangliósido G3 (GD3), receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER-2), telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT), subunidad alfa 2 de receptor de interleucina 13 (IL-13Ra2), cadena ligera ic, receptor de dominio de inserción de cinasa (KOR), Lewis Y (LeY), molécula de adhesión celular LI (L1CAM), familia A de antígeno de melanoma 1 (MAGE-A1), mucina 1 (MUC1), mesotelina (MSLN), ligandos de NKG2D, antígeno de cáncer de testículos NY-ES0-1, antígeno oncofetal (h5T4), antígeno de células madre de próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), glicoproteína asociada a tumor 72 (TAG-72), R2 de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2), o proteína de tumor de Wilms (WT-1).

Como consecuencia de la expresión en superficie de un receptor que se une a un antígeno tumoral y activa la célula inmunosensible (por ejemplo, TCR, CAR) y un vector que codifica para un receptor que se une a otro antígeno tumoral y estimula la célula inmunosensible (por ejemplo CCR), se dota a células NK o T humanas transferidas de manera adoptiva de una actividad citolítica aumentada y selectiva en el sitio de tumor. Además, tras su ubicación en el tumor o la infección viral y su proliferación, las células T que expresan ligando coestimulante convierten el sitio de tumor o infección viral en un entorno altamente conductor para una amplia gama de células inmunitarias que participan en la respuesta fisiológica antitumoral o antiviral (linfocitos de infiltración tumoral, células NK, NKT, células dendríticas y macrófagos).

En otras realizaciones, se proporciona una célula inmunosensible de la presente invención para su uso en el tratamiento de sujetos con una infección por patógeno (por ejemplo, infección viral, infección bacteriana, infección fúngica, infección por parásito o infección por protozoo). La invención es particularmente útil para potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto inmunocomprometido. Las infecciones virales a modo de ejemplo susceptibles de tratamiento usando un método de la invención incluyen, pero no se limitan a, infecciones por citomegalovirus (CMV), virus de Epstein Barr (VEB), virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y virus de la gripe.

Por consiguiente, se da a conocer un método de tratamiento o prevención de una infección por patógeno en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de una célula inmunosensible tal como se describe en el presente documento.

#### Kits

Se dan a conocer kits para el tratamiento o la prevención de una neoplasia, infección por patógeno, trastorno inmunitario o trasplante alogénico. En una realización, el kit incluye una composición terapéutica o profiláctica que contiene una cantidad eficaz de una célula inmunosensible que comprende un receptor de antígeno activante y un receptor de antígeno coestimulante en forma de dosificación unitaria. En un ejemplo particular, las células comprenden además un ligando coestimulante. En algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente estéril que contiene una vacuna terapéutica o profiláctica; tales recipientes pueden ser cajas, ampollas, frascos, viales, tubos, bolsas, sobres, envases de tipo blíster u otras formas de recipiente adecuadas conocidas en la técnica. Tales recipientes pueden fabricarse de plástico, vidrio, papel laminado, lámina de metal u otros materiales adecuados para contener medicamentos.

Si se desea, la célula inmunosensible se proporciona junto con instrucciones para administrar la célula a un sujeto que tiene o que corre el riesgo de desarrollar una neoplasia, infección por patógeno, trastorno inmunitario o trasplante alogénico. Las instrucciones incluirán generalmente información sobre el uso de la composición para el tratamiento o la prevención de neoplasia, infección por patógeno, trastorno inmunitario o trasplante alogénico. En otras realizaciones, las instrucciones incluyen al menos uno de los siguientes: descripción del agente terapéutico; programa de dosificación y administración para el tratamiento o la prevención de una neoplasia, infección por patógeno, trastorno inmunitario o trasplante alogénico o síntomas de los mismos; precauciones; advertencias; indicaciones; contraindicaciones; información sobre sobredosis; reacciones adversas; farmacología en animales; estudios clínicos; y/o referencias. Las instrucciones pueden imprimirse directamente en el recipiente (cuando está presente), o como etiqueta aplicada al recipiente, o como una hoja independiente, folleto, tarjeta o carpeta suministrada en o con el recipiente.

#### Ejemplos

La puesta en práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de alcance del experto en la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller y Cales, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991). Estas técnicas pueden aplicarse a la producción de los polinucleótidos y polipéptidos

de la invención, y, como tales, pueden considerarse en la realización y puesta en práctica de la invención. En las siguientes secciones se comentarán técnicas particularmente útiles para realizaciones particulares.

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos habituales en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo realizar y usar el ensayo, examen y métodos terapéuticos de la invención, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran como su invención.

*Ejemplo 1. Células T que expresan conjuntamente un receptor de antígeno quimérico (CAR) y un receptor coestimulante quimérico (CCR) erradicaron tumores establecidos.*

Se dan a conocer “células T que detectan tumores” que implican simultáneamente dos antígenos expresados conjuntamente por una célula tumoral. De manera importante, se ha encontrado que la reactividad frente a tejidos que expresan cualquiera de los antígenos solos debe ser despreciable, provocando únicamente la activación de células T en presencia de ambos antígenos pero no cualquiera de los mismos solos. La invención se basa al menos en parte en los descubrimientos de que en combinación proporcionan inmunorreactividad de células T selectiva, y, por tanto, hacen que este enfoque sea clínicamente relevante. Lo primero es asignar la activación de células T frente a un antígeno (por ejemplo, CD19 o antígeno de células madre de próstata, PSCA), que puede mediarse por un receptor de células T (TCR) o un receptor de antígeno quimérico (CAR). La coestimulación está mediada de manera independiente por un “receptor coestimulante quimérico” (CCR),<sup>12,13</sup> que se dirige a un segundo antígeno (por ejemplo, antígeno de membrana específico de próstata, PSMA). Este enfoque dio como resultado una inmunorreactividad aumentada frente a tumores positivos para antígeno doble (DP), pero no logró evitar la inmunorreactividad potenciada frente a tumores positivos para antígeno individual (SP). El segundo principio importante para células T que detectan tumores para distinguir tumores DP de tumores SP, es disminuir la activación de células T hasta un nivel en el que por sí sola es ineficaz, pero rescatada funcionalmente en el sitio de tumor por un CCR implicado por un antígeno independiente expresado conjuntamente. Dado que los CAR y CCR reconocen antígenos de superficie celular en vez de complejos de HLA-péptido, las células T modificadas por ingeniería de esta manera se dirigen directamente al tumor y no se coestimularán mediante la interacción con células que presentan de manera cruzada los antígenos seleccionados como diana. Tal como se demuestra en el presente documento, este enfoque dio como resultado la erradicación de tumor selectiva en ratones que portaban múltiples tumores.

Para demostrar que pueden suministrarse *in vivo* señales tanto de activación de células T como de coestimulación usando dos receptores específicos de antígeno distintos, se evaluó la combinación de un CAR, que proporciona una señal de activación de CD3 tras el reconocimiento del marcador de células B CD19<sup>14</sup> y un CCR específico para PSMA<sup>12,15</sup>. Debido a la sinergia entre CD28 y 4-1 BB<sup>16,17</sup>, incluyendo los dominios citoplasmáticos en tándem<sup>18-21</sup>, se añadió el dominio citoplasmático de 4-1 BB al CCR de PSMA P28<sup>15</sup> tal como se describe<sup>21</sup> (figura 1A). Se transdujeron células T de sangre periférica humanas primarias con los receptores 19z1 y/o P28BB y mostraron una expresión fácilmente detectable de ambos receptores, con eficiencias de transducción en el intervalo del 45-70% (figura 1B). Se analizaron cuatro grupos de células T en todos los estudios posteriores, que comprendían CAR anti-CD19 (19z1), CCR anti-PSMA (P28BB), tanto CAR anti-CD19 como CCR anti-PSMA en combinación (19z1+P28BB), y un grupo de control sometido a transducción simulada (simulado) (figura 1C). La citotoxicidad *in vitro* y la respuesta proliferativa tras la exposición a CD19 y/o PSMA mostraron que la citotoxicidad dirigida contra CD19 se confería, tal como se esperaba, por 19z1 y no se veía alterada en presencia de PSMA.

Una comparación cuantitativa de los grupos de células T, normalizados frente a la fracción de células T transducidas con 19z1 para los grupos 19z1 y 19z1+P28BB y la fracción transducida con P28BB en el grupo P28BB, mostró que las células T 19z1 y 19z1+P28BB producían la lisis específica del 40-47% de las dianas CD19<sup>+</sup> a una razón E:T de 50:1 mientras que las células T transducidas con P28BB no lograron producir la lisis de dianas PSMA<sup>+</sup> (figura 2A). Sin embargo, tras la exposición repetida a estos antígenos en ausencia de citocina exógena, sólo las células T 19z1+P28BB mostraron una proliferación robusta con una expansión de 58 veces durante 31 días cuando se cultivaron de manera conjunta con células presentadoras de antígenos artificiales (AAPC) que expresaban ambos antígenos. En comparación, las células T 19z1 o P28BB sólo presentaron una expansión moderada a lo largo de los primeros 14 días, al igual que las células T 19z1+P28BB con APC de CD19+PSMA (figura 2B). Se proporcionaron evidencias adicionales de una activación más fuerte de células T en presencia de ambos antígenos mediante la evaluación cuantitativa de la producción de citocinas y la inducción de la molécula antiapoptótica BclxL en células T 19z1+P28BB, que fueron claramente superiores en presencia de APC C019<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup> que en presencia de cualquiera de los antígenos solos (figuras 4A, 4E).

Inicialmente, se sometió a prueba la capacidad *in vivo* de estas células T de expresión de receptor doble para erradicar tumores de próstata humanos sistémicos establecidos en ratones NOD/SCID-yC KO (NSG) inmunocomprometidos que portaban células tumorales (C019<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup>) positivas dobles. Se sometieron sistémicamente los ratones NSG a injerto con 2,0 x 10<sup>6</sup> células de tumor PC3 que expresaban luciferasa de luciérnaga que expresaban tanto C019 como PSMA (figura 5) y se trataron 19 días después con una única infusión intravenosa de 1,0 x 10<sup>6</sup> células T 19z1, 19z1+P28BB, P28BB o de control. Treinta y cinco días después, se sacrificaron los ratones que recibieron células T P28BB o células T de control debido a la carga tumoral. En cambio, los ratones tratados con células T 19z1 tenían una reducción marcada de la carga tumoral. Sorprendentemente, los ratones tratados con células T 19z1+P28BB tenían una carga tumoral indetectable (figura 2C). A lo largo de 70 días de monitorización tras la infusión, los tumores

C019<sup>+</sup> presentaron eventualmente recidiva en ratones que recibieron células T 19z1, mientras que la remisión completa persistió en todos los ratones que recibieron células T 19z1+P28BB (figura 2C). Este resultado indicó fuertemente que se había logrado la erradicación de tumor.

5 Sin embargo, estos hallazgos planteaban una preocupación debido a la posible erradicación inicial de tumores C019<sup>+</sup>PSMA<sup>-</sup> mediante células T 19z1+P28BB. Había una probabilidad de que la inmunorreactividad de células T se potenciara de manera indeseable en los destinatarios que portaban tumores C019<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup> dobles positivos debido a la recirculación de células T. Para someter a prueba esta hipótesis, se sometieron ratones a infusión subcutánea con tumores C019<sup>+</sup>PSMA<sup>-</sup> en los costados izquierdos, tumores C019<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup> en los costados derechos, y tumores C019<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup> en sus lomos. Una semana después, se administró a los ratones una de células T 19z1, P28BB o 10 19z1+P28BB (1,0 x 10<sup>6</sup> células) por vía intravenosa. Los ratones que recibieron células T P28BB tuvieron progresión de los tres tumores y fue necesario sacrificarlos dentro del plazo de 35 días (figura 20). En los ratones tratados con células T 19z1, los tumores C019<sup>+</sup>PSMA<sup>-</sup> y C019<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup> experimentaron una reducción sustancial en comparación con su progresión en destinatarios de células T P28BB, antes de presentar eventualmente progresión. De manera compatible con resultados anteriores, los ratones tratados con células T 19z1+P28BB mostraron una erradicación completa de tumores C019<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup>. Sin embargo, tal como se planteó en la hipótesis, también se potenció 15 sustancialmente el rechazo de tumores C019<sup>+</sup>PSMA<sup>-</sup> y fue superior al observado en destinatarios de células T 19z1 (figura 20, paneles inferiores). Por tanto, un enfoque de señales divididas que seleccionó como diana dos antígenos no logró restringir la reactividad de células T y proteger a los tumores de antígeno individual.

20 Para abordar el problema de la reactividad frente a antígeno individual, se propuso que tendría que minimizarse la activación de células T, casi hasta el punto de la extinción, sólo para rescatarse en el sitio de expresión de antígenos dobles mediante una implicación de CCR adecuada. Por tanto, se buscaron CAR con actividad reducida. Para estos experimentos, se usó una combinación clínicamente relevante de antígenos que seleccionaban como diana PSCA y PSMA. Se evaluaron tres scFv específicos de PSCA con diferentes afinidades de unión por PSCA (figura 3A). Mientras que el scFv de Hzl produjo eficazmente la lisis de células tumorales hasta el intervalo de picogramos, el scFv de Lzl requirió 1.000 – 10.000 veces más anticuerpo para lograr una eficiencia similar de lisis específica. Se usaron estos scFv para derivar tres CAR basados en CD3 con diferentes actividades en ensayos de citotoxicidad (figura 3B). Dos de los CAR, Hzl y Mzl, dirigieron una actividad lítica moderada frente a dianas PSCA<sup>+</sup> (lisis específica al 20% a la razón de E:T de 50:1). En cambio, el tercer CAR, Lzl, sólo alcanzó el 10%, calificándolo como receptor de antígeno ineficaz. Esta jerarquía se confirmó adicionalmente en ensayos de liberación de citocinas, que mostraron una secreción de citocinas potenciada por células T 19z1+P28BB (figura 4A) y células T Hzl+P28BB (figura 4B) en comparación con células con cualquiera de los receptores solos. Esta potenciación fue menor en células T Mzl+P28BB (figura 4C) y disminuyó incluso más en células T Lzl+P28BB (figura 4D).

35 Con el fin de evaluar la eficacia terapéutica y el perfil de direccionamiento de células T reactivas PSCA+PSMA<sup>-</sup>, se sometió a prueba la actividad antitumoral de estas células T en animales que portaban tumores PSCA+PSMA<sup>-</sup> y/o PSCA+PSMA<sup>+</sup>. En primer lugar, para someter a prueba la capacidad de células T Mzl+P28BB y Lzl+P28BB para erradicar de manera selectiva células PSCA+PSMA<sup>+</sup>, se inocularon a ratones por vía intravenosa 2 x 10<sup>6</sup> células PC3 que expresaban FFLuc positivas para PSMA, PSCA o ambos (figura 5). Catorce días después, un conjunto de ratones recibió 1 x 10<sup>6</sup> células T Mzl+P28BB CAR<sup>+</sup> por infusión intravenosa, y otro conjunto recibió 1 x 10<sup>6</sup> células T Lzl+P28BB CAR<sup>+</sup>. Los ratones que portaban células tumorales PSCA+PSMA que se trataron con las células T Mzl+P28BB más eficaces mostraron una mayor regresión tumoral que los ratones tratados con células T Lzl+P28BB (figura 3C). De manera similar al experimento con CD19 (figura 2C), estos tumores presentaron eventualmente recidiva 45 y progresión. Sin embargo, en ratones que portaban células tumorales PSCA+PSMA<sup>+</sup>, las células T Mzl+P28BB indujeron una erradicación de tumor robusta y a largo plazo. De manera compatible con la menor potencia de las células T Lzl+P28BB, la erradicación de tumor en ratones que portaban células tumorales PSCA+PSMA<sup>+</sup> tratados con células T Lzl+P28BB fue más lenta pero no obstante igual de satisfactoria, dando como resultado una erradicación de tumor fuerte y supervivencia a largo plazo de todos los ratones tratados (figura 3C). La erradicación de tumor no se potenció en ratones de control que portaban tumores o bien PSCAVSMA<sup>-</sup> o bien PSCA-PSMA<sup>+</sup> (figura 3C). Se sometió a prueba una evaluación más rigurosa de la actividad de fondo frente a tumores PSCAVSMA<sup>-</sup> en el contexto de animales que también portaban tumores PSCA+PSMA<sup>+</sup> y PSCAPSMA<sup>+</sup>. Las células T Lzl+P28BB mediaron en la erradicación de tumores PSCA+PSMA<sup>+</sup> sin aumentar la erradicación de tumores PSCA+PSMA (figura 3E), que no era diferente de la inducida por células T Lzl.

55 Por tanto, estos resultados demuestran la viabilidad de reducir la activación de células T hasta el punto de evitar la reactividad inmunitaria frente a tejidos que expresan un antígeno seleccionado como diana y rescatar la activación de células T en el sitio de tumor en el que se expresan conjuntamente antígenos, sin correr el riesgo de iniciar reactividad frente a los tejidos que expresan un antígeno individual. Haciendo esto, los resultados demuestran prueba de concepto para lograr dos desenlaces complementarios que determinan la especificidad y seguridad: 1) la capacidad para crear especificidad de direccionamiento en ausencia de un antígeno diana único mediante reconocimiento de antígenos combinatorio; y 2) la protección de células que expresan únicamente uno de los antígenos ajustando las señales de activación y coestimulantes, para confinar prácticamente la activación a sitios de expresión conjunta de antígenos diana.

65 Las terapias con células T dirigidas tienen la posibilidad de proporcionar tratamientos curativos, pero su aplicabilidad

está limitada por la escasez de dianas específicas de tumor validadas. De hecho, la expresión extratumoral da como resultado efectos “en diana, fuera de tumor” que 2-4” algunas veces pueden ser tolerables pero son eventualmente letales<sup>11</sup>. El método descrito en el presente documento proporciona direccionamiento mejorado suministrando señales de activación y coestimulación ajustadas mediante reconocimiento de antígenos combinatorio (figuras 6A-6C).

En la presentación de antígenos fisiológica,<sup>22</sup> se sensibilizan células T en ganglios linfáticos recibiendo señales de activación y coestimulantes y migrando a sitios periféricos, en los que las funciones efectoras de las células T no dependen de la coestimulación. De manera similar, las células T implicadas mediante un receptor de antígeno y un CCR pueden recircular a otros sitios periféricos y presentar una actividad citolítica intensificada frente a tejidos que expresan únicamente uno de los antígenos seleccionados como diana (figura 6A). Por tanto, la presente estrategia se desarrolló para abordar este problema de un posible efecto sistémico con el fin de proteger a células positivas de manera individual para el antígeno, incluyendo células no tumorales (figura 6B). En un modelo de ratón de tres tumores (PSCA<sup>+</sup>, PSMA<sup>+</sup>, y PSCA<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup>), se logró la erradicación de PSCA<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup>, mientras que se protegieron los tumores PSCA<sup>+</sup>PSMA<sup>-</sup> y PSCA<sup>-</sup>PSMA<sup>+</sup> (figura 3E).

Tal como se muestra mediante los presentes estudios, esta selectividad por tumores DP puede lograrse reduciendo la eficacia del CAR, lo cual crea células que son menos citotóxicas (figura 3B) y que tienen niveles reducidos de secreción de citocinas (figuras 4A-4D). Aunque los niveles de citocinas tanto TH1 como TH2 son relativamente altos para CAR tanto de 19z1 como de Hzl, el uso de los CAR de Mzl y Lzl menos eficaces dio como resultado la reducción de estos niveles. La potenciación de los niveles de citocinas en células T Lzl+P2888 en comparación con células T Lzl fue mínima excepto para IL-2 e IL-13. Mientras que IL-2 induce la proliferación y puede fomentar una respuesta o bien de TH 1 o bien de TH2<sup>23</sup>, IL-13 está asociada con una respuesta de TH2 específica para la señalización de 4-1BB/CD137.<sup>24,25</sup>

PSCA y PSMA son dianas prometedoras para el tratamiento de cáncer de próstata metastásico<sup>26,27</sup>, aunque ninguna es absolutamente específica de próstata. En sujetos humanos, se encuentra expresión de PSCA en cáncer de próstata y dentro de la pelvis renal, uréter, vejiga urinaria y uretra.<sup>28</sup> La expresión de PSMA se correlaciona fuertemente con cáncer de próstata primario, metástasis, así como en astrocitos de tipo II, el túbulo proximal del riñón y el borde ciliado intestinal.<sup>29</sup> Por tanto, se espera que la selección como diana doble de PSCA/PSMA aumente la selección como diana de cáncer de próstata y reduzca la reactividad frente a estos tejidos normales. Se aprecia que este principio puede extenderse a otros tipos de tumor que expresen un par de antígenos, especialmente aquellos que confieren auténtica especificidad tumoral. Por ejemplo, pueden usarse HER2, MUC1, CD44, CD49f y/o EpCAM de esta manera para tratar cáncer de mama.<sup>30</sup> Asimismo, puede usarse mesotelina, receptor de folato- $\alpha$ , CD44 y/o CD133 para tratar cáncer de ovarios.<sup>32,33</sup> La selección como diana de células que inician tumor o células madre cancerosas, para las que aún no se han identificado claramente antígenos/estructuras diana únicos<sup>34,35</sup> será particularmente atractiva usando este enfoque.

Un aspecto importante de este enfoque es restringir y casi eliminar la activación de células T en respuesta a un antígeno individual. Se encontró que CAR con baja afinidad o baja avidéz que sólo proporcionan una señal de activación escasa eran útiles para lograr este efecto. Alternativamente, puede usarse un TCR endógeno con baja afinidad o baja avidéz en combinación con un CCR para proporcionar coestimulación específica de antígeno. En conjunto, los resultados indican las ventajas de restringir la actividad de células T modificadas por ingeniería, reconciliando la potencia con la seguridad mediante reconocimiento de antígenos combinatorio por células T que detectan tumores.

#### *Producción viral y construcción de vector gammaretroviral*

El vector gammaretroviral SFG-19z1 se ha descrito ampliamente.<sup>14</sup> Este constructo de estructura principal se usó para intercambiar scFv para generar SFG-Hzl, SFG-Mzl y SFG-Lzl mediante clonación direccional usando un sitio Neel ubicado en 5' del scFv y un sitio Nod ubicado en 3' del scFv. Para generar SFG-P28BB, los dominios CD28 y CD137 fusionados se amplificaron mediante PCR a partir de SFG-P28BBz1 y se ligaron en 3' del scFv de PSMA usando un sitio Neel en 5' y un sitio BamHI en 3' para incluir un codón de terminación en 3' del dominio BB, mientras que se retiró el dominio de CD3.<sup>21</sup> La expresión génica bicistrónica para CAR que va a expresarse conjuntamente con dsRED y CCR que van a expresarse conjuntamente con hrGFP se logró usando un sitio interno de entrada al ribosoma tal como se describió anteriormente. Se usaron vectores para transfectar de manera transitoria líneas celulares para generar líneas de producción viral estables tal como se describió anteriormente.

#### *Generación de scFv anti-PSCA*

Se generaron tres scFv específicos de PSCA novedosos, denominados Hzl, Mzl y Lzl, amplificando los dominios pesado variable (VH) y ligero variable (VL) que confieren especificidad de antígeno PSCA de epítomos no solapantes usando cebadores degenerados a partir de hibridomas tal como se describió anteriormente.<sup>36</sup> Se fusionaron estos dominios VH y VL entre sí usando un ligador y se usaron para sustituir al scFv de CD19 en la estructura principal de SFG-19z1 usando sitios SphI en 5' a NotI en 3'.

#### *Aislamiento, transducción retroviral y cultivo de células T humanas primarias*



Se aislaron leucocitos de sangre periférica usando gradientes de Ficoll y se transdujeron tal como se describió anteriormente. En resumen, tras una activación de 48 horas con fitohemaglutinina 2 &g/ml, se transdujeron células dos veces mediante espinoculación durante 1 hora sobre placas recubiertas con retronectina a lo largo de las siguientes 48 horas y se añadieron 20 U/ml de IL-2. Tras dejar 3 días para la expresión de vector, se determinaron las eficiencias de transducción mediante citometría de flujo y se usaron células sin clasificar a granel para diversos ensayos o transferencias adoptivas.

#### *Generación de líneas de células tumorales que expresan antígeno*

Se obtuvo la línea de tumor de próstata humano PC3 a partir del ATCC y se transdujo de manera retroviral<sup>16</sup> con el fin de generar PC3-GFP/Luc, que se usó posteriormente para crear 10 PC3-CD19, PC3-PSMA, PC3-CD19-PSMA, PC3-PSCA y PC3-PSCA-PSMA mediante transducción retroviral.

#### *Ensayos de destrucción y liberación de cromo de CTL*

Se marcaron células diana que expresaban el antígeno deseado con <sup>51</sup>Cr y se cultivaron conjuntamente con células T a razones de efector:diana decrecientes. Tras 4 horas de cultivo, se retiró el sobrenadante y se usó para medir la radiactividad liberada a partir del cromo. Se determinó la lisis específica restando la radiactividad de fondo de células diana no cultivadas con células T y dividiendo entre la radiactividad medida a partir de células diana sometidas completamente a lisis usando Triton X-100 al 0,2%.

#### *Ensayos de proliferación de células T a largo plazo*

Se irradiaron células tumorales que expresaban el antígeno deseado con 30 Gy antes del cultivo conjunto con 1,0 x 10<sup>6</sup> células T a una razón de efector:diana de 5:1. Se contaron las células T cada semana usando un contador de células Invitrogen Countess y después volvieron a estimularse con células tumorales irradiadas. No se añadieron citocinas exógenas a estos cultivos conjuntos.

#### *Generación de modelos de tumor en ratones*

Se aplicaron por infusión células de tumor PC3 en ratones NOD/SCID-IL2Ry obtenidos o bien a partir de Jackson Laboratories o bien a partir de cría interna según el protocolo 04-10-024 aprobado por el Comité institucional para el uso y cuidado de animales MSKCC. Para experimentos de tumores sistémicos, se aplicaron por infusión 2,0 x 10<sup>6</sup> tumores al interior de ratones con 1,0 x 10<sup>6</sup> células T positivas para receptor quimérico aplicadas por infusión 14 días después. Para experimentos de tumores subcutáneos, se inyectaron 1,0 x 10<sup>6</sup> células tumorales por sitio de tumor, se establecieron durante 7 días tras lo cual se aplicaron por infusión i.v. 1,0 x 10<sup>6</sup> células T positivas quiméricas.

#### *Cuantificación de carga tumoral*

Para experimentos de tumores sistémicos, se usó obtención de imágenes por bioluminiscencia (BLI) para medir cuantitativamente la carga tumoral correlacionando la cantidad de carga tumoral con la luminiscencia usando un sistema IVIS 100 (Caliper Life Sciences) tal como se describió anteriormente. Para tumores subcutáneos, se usaron calibres para medir el tamaño tumoral. Se calculó el volumen tumoral multiplicando la longitud, anchura y altura de cada tumor.

#### *El anticuerpo biespecífico medió en la lisis tumoral*

Se añadieron anticuerpos biespecíficos que contenían un scFv específico de PSCA fusionado a un scFv específico de CD3 en diversas cantidades a células T no transducidas cultivadas conjuntamente con PC3 PSCA<sup>+</sup> a una razón de 20:1, respectivamente en ensayos de ensayo de liberación de cromo durante 4 h convencionales.

#### *Citometría de flujo*

Se analizaron células usando un citómetro de flujo LSR II o se clasificaron usando un clasificador celular FACS Aria (BO Biosciences) tal como se describió anteriormente.<sup>16</sup> La detección de receptor quimérico en la superficie celular puede lograrse directamente usando anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con AF647 (Invitrogen). Se obtuvieron anticuerpos para CD4-PE-Cy7, CDS-Pacific Blue y CD19-APC a partir de Invitrogen mientras que se purificaron anticuerpos contra PSCA a partir de sobrenadantes de hibridoma y se obtuvieron anticuerpos contra PSMA a partir de MBL Interantional.

#### *Análisis de citocinas*

Se recogieron sobrenadantes 48 horas tras la segunda estimulación tumoral a partir de experimentos de proliferación de células T a largo plazo y se usaron para el análisis de citocinas usando un sistema de multiplex personalizado HCYTMAG-60K (Millipore) y se analizaron usando un instrumento Luminex 100 (Luminex) tal como se describió

anteriormente.<sup>21</sup>

*Análisis de inmunotransferencia de tipo Western*

5 Se recogieron células 24 horas tras la estimulación tumoral inicial a partir de experimentos de proliferación de células T a largo plazo para usarse para análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la expresión de Bclxl. Se realizaron inmunotransferencias de tipo Western tal como se describió anteriormente<sup>21</sup> usando anticuerpos primarios contra Bclxl y Akt (Cell Signaling Technology).

10 **Bibliografía**

1. Robbins, P.F. *et al.* Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 917-924 (2011).

15 2. Kalos, M. *et al.* T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 3, 95ra73 (2011).

3. Brentjens, R.J. *et al.* Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood* 118, 4817-4828 (2011).

20 4. Kochenderfer, J.N. *et al.* B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood* 119, 2709-2720 (2012).

25 5. Sadelain, M., Riviere, I. y Brentjens, R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat Rev Cancer* 3, 35-45 (2003).

6. Ho, W.Y., Blattman, J.N., Dossett, M.L., Yee, C. y Greenberg, P.O. Adoptive immunotherapy: engineering T cell responses as biologic weapons for tumor mass destruction. *Cancer cell* 3, 431-437 (2003).

30 7. Rosenberg, S.A., Restifo, N.P., Yang, J.C., Morgan, R.A. y Dudley, M.E. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer* 8, 299-308 (2008).

8. Sadelain, M., Brentjens, R. y Riviere, I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr Opin Immunol* 21, 215-223 (2009).

35 9. Jorritsma, A., Schotte, R., Coccoris, M., de Witte, M.A. y Schumacher, T.N. Prospects and limitations of T cell receptor gene therapy. *Current gene therapy* 11, 276-287 (2011).

40 10. Johnson, L.A. *et al.* Gene therapy with human and mouse T, cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* 114, 535-546 (2009).

11. Morgan, R.A. *et al.* Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 843-851 (2010).

45 12. Krause, A. *et al.* Antigen-dependent CD28 signaling selectively enhances survival and proliferation in genetically modified activated human primary T lymphocytes. *J Exp Med* 188, 619-626 (1998).

50 13. Wilkie, S. *et al.* Dual Targeting of ErbB2 and MUC1 in Breast Cancer Using Chimeric Antigen Receptors Engineered to Provide Complementary Signaling. *Journal of clinical immunology* (2012), vol. 32, págs. 1059-1070.

14. Brentjens, R.J. *et al.* Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes costimulated by CD80 and interleukin-15. *Nature medicine* 9, 279-286 (2003).

55 15. Maher, J., Brentjens, R.J., Gunset, G., Riviere, I. y Sadelain, M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol.* 20, 70-75 (2002).

16. Stephan, M.T. *et al.* T cell-encoded CD80 and 4-1BBL induce auto- and trans-costimulation, resulting in potent tumor rejection. *Nature medicine* 13, 1440-1449 (2007).

60 17. Watts, T.H. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annual review of immunology* 23, 23-68 (2005).

65 18. Wang, J. *et al.* Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains. *Human gene therapy* 18, 712-725 (2007).

- 5 19. Carpenito, C. *et al.* Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 3360-3365 (2009).
20. Tammana, S. *et al.* 4-1BB and CD28 signaling plays a synergistic role in redirecting umbilical cord blood T cells against B-cell malignancies. *Hum Gene Ther* 21, 75-86 (2010).
- 10 21. Zhong, X.S., Matsushita, M., Plotkin, J., Riviere, I. y Sadelain, M. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3 kinase/AKT/Bcl-2 activation and CD8+ T cell-mediated tumor eradication. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 413-420 (2010).
22. Schwartz, R. H. T cell anergy. *Annual review of immunology* 21, 305-334 (2003).
- 15 23. Liao, W., Lin, J.X. y Leonard, W.J. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Current opinion in immunology* 23, 598-604 (2011).
24. Nam, K. O., Shin, S. M. y Lee, H.W. Cross-linking of 4-1BB up-regulates IL-13 expression in CD4(+) T lymphocytes. *Cytokine* 33, 87-94 (2006).
- 20 25. Shin, S M. *et al.* 4-1BB triggers IL-13 production from T cells to limit the polarized, Th1-mediated inflammation. *Journal of leukocyte biology* 81, 1455-1465 (2007).
26. Saeki, N., Gu, J., Yoshida, T. y Wu, X. Prostate stem cell antigen: a Jekyll and Hyde molecule? *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 3533-3538 (2010).
27. Olson, W.C., Heston, W.D. y Rajasekaran, A.K. Clinical trials of cancer therapies targeting prostate-specific membrane antigen. *Reviews on recent clinical trials* 2, 182-190 (2007).
- 30 28. Lam, J.S. *et al.* Prostate stem cell antigen is overexpressed in prostate cancer metastases. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 11, 2591-2596 (2005).
29. Silver, D.A., Pellicer, I., Fair, W.R., Heston, W.D. y Cordon-Cardo, C. Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 3, 81-85 (1997).
- 35 30. Liu, J.C. *et al.* Seventeen-gene signature from enriched Her2/Neu mammary tumor-initiating cells predicts clinical outcome for human HER2+ breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 5832-5837 (2012).
- 40 31. Meyer, M.J. *et al.* CD44<sup>pos</sup>CD49f<sup>hi</sup>CD133/2<sup>hi</sup> defines xenograft-initiating cells in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer research* 70, 4624-4633 (2010).
32. Strauss, R. *et al.* Analysis of epithelial and mesenchymal markers in ovarian cancer reveals phenotypic heterogeneity and plasticity. *PLoS one* 6, e16186 (2011).
- 45 33. Shihle, M. y Davidson, B. Pathogenesis of ovarian cancer: clues from selected overexpressed genes. *Future Oncol* 5, 1641-1657 (2009).
- 50 34. Nguyen, L.V., Vanner, R., Dirks, P. y Eaves, C.J. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nature reviews. Cancer* 12, 133-143 (2012).
35. Magee, J.A., Piskounova, E. y Morrison, S.J. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer cell* 21, 283-296 (2012).
- 55 36. Orlandi, R., Gussow, D.H., Jones, P.T. y Winter, G. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 3833-3837 (1989).

60 **Lista de secuencias**

<110> Memorial Sloan-Kettering Cancer Center  
 Sadelain, Michel  
 Kloss, Christopher C

65 <120> Composiciones y métodos para inmunoterapia

ES 2 743 738 T3

<130> 3314.040AWO

<150> Documento US61/709.072

5 <151> 02-10-2012

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1

<211> 164

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 1

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu  
1 5 10 15

Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys  
20 25 30

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

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr  
50 55 60

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg  
65 70 75 80

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met  
85 90 95

Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn  
100 105 110

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met  
115 120 125

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly  
130 135 140

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala  
145 150 155 160

Leu Pro Pro Arg

20 <210> 2

<211> 235

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 2

ES 2 743 738 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr  
 20 25 30

Trp Asn Leu Gly Glu Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser  
 35 40 45

Asn Pro Thr Ser Gly Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala  
 50 55 60

Ala Ser Pro Thr Phe Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala  
 65 70 75 80

Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp  
 85 90 95

Thr Phe Val Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr  
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe  
 115 120 125

Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg  
 130 135 140

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg  
 145 150 155 160

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly  
 165 170 175

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr  
 180 185 190

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His  
 195 200 205  
 Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser  
 210 215 220

Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val  
 225 230 235

5 <210> 3  
 <211> 220  
 <212> PRT

ES 2 743 738 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

5

Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val  
1 5 10 15

Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr  
20 25 30

Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser  
35 40 45

Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu  
50 55 60

Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser  
65 70 75 80

Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr  
85 90 95

Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys  
100 105 110

Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser  
115 120 125

Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro  
130 135 140

Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly  
145 150 155 160

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile  
165 170 175

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met  
180 185 190

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro  
195 200 205

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser  
210 215 220

<210> 4

<211> 255

<212> PRT

10

<213> *Homo sapiens*

ES 2 743 738 T3

<400> 4

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu  
1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro  
20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys  
35 40 45

Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile  
50 55 60

Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser  
65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly  
85 90 95

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu  
100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln  
115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys  
130 135 140

Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro  
145 150 155 160

Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala  
165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu  
180 185 190

ES 2 743 738 T3

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu  
 195 200 205

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe  
 210 215 220

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly  
 225 230 235 240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu  
 245 250 255

<210> 5  
 <211> 288  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 5

Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr  
 1 5 10 15

Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys  
 20 25 30

Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu  
 35 40 45

Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile  
 50 55 60

Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp  
 65 70 75 80

Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr  
 85 90 95

Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly  
 100 105 110

Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg  
 115 120 125

Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr  
 130 135 140

Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile  
 145 150 155 160

10



ES 2 743 738 T3

Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu  
 165 170 175

Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp  
 180 185 190

Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met  
 195 200 205

Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg  
 210 215 220

Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro  
 225 230 235 240

Asp Asn Leu Leu Pro Ser Trp Ala Ile Thr Leu Ile Ser Val Asn Gly  
 245 250 255

Ile Phe Val Ile Cys Cys Leu Thr Tyr Cys Phe Ala Pro Arg Cys Arg  
 260 265 270

Glu Arg Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val  
 275 280 285

<210> 6  
 <211> 182  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 6

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg  
 1 5 10 15

Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gly  
 20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser  
 35 40 45

Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val  
 50 55 60

Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln  
 65 70 75 80

Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn  
 85 90 95

10

ES 2 743 738 T3

Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu  
 100 105 110

Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu  
 115 120 125

Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr  
 130 135 140

Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Tyr Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp  
 145 150 155 160

Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro  
 165 170 175

Gly Glu Phe Cys Val Leu  
 180

<210> 7

<211> 451

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

His Ala Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro  
 20 25 30

Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser  
 35 40 45

Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu  
 50 55 60

Trp Ile Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly  
 65 70 75 80

Lys Phe Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr  
 85 90 95

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

Glu Cys Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp  
 115 120 125

10

ES 2 743 738 T3

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr  
 145 150 155 160  
 Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val  
 165 170 175  
 Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln  
 180 185 190  
 Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr  
 195 200 205  
 Arg Asn Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
 210 215 220  
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Lys Asp Leu Ala Asp  
 225 230 235 240  
 Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly  
 245 250 255  
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Pro Thr Thr Thr Pro Ala  
 260 265 270  
 Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser  
 275 280 285  
 Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr  
 290 295 300  
 Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala  
 305 310 315 320  
 Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys  
 325 330 335  
 Asn Phe Ile Arg Val Lys Glu Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr  
 340 345 350  
 Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg  
 355 360 365  
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met  
 370 375 380

ES 2 743 738 T3

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

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys  
405 410 415

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu  
420 425 430

Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu  
435 440 445

Pro Pro Arg  
450

<210> 8

<211> 478

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

His Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro  
20 25 30

Gly Thr Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
35 40 45

Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu  
50 55 60

Trp Ile Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln  
65 70 75 80

Lys Phe Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr  
85 90 95

Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr  
100 105 110

Tyr Cys Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
115 120 125

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
130 135 140

10

ES 2 743 738 T3

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser  
 145 150 155 160

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

Val Gly Thr Ala Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
 180 185 190

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp  
 195 200 205

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr  
 210 215 220

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn  
 225 230 235 240

Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Met Leu Asp Leu Lys Arg  
 245 250 255

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

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

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

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

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

Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr  
 340 345 350

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

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

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val

ES 2 743 738 T3

385 390 395 400

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg  
405 410 415

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys  
420 425 430

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg  
435 440 445

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys  
450 455 460

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
465 470 475

<210> 9

<211> 245

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Glu Ser Ser Tyr  
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
115 120 125

10 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser

ES 2 743 738 T3

130

135

140

Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys  
145 150 155 160

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
165 170 175

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

Ser Gly Val Pro Asp Arg Glu Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
195 200 205

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

Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys  
225 230 235 240

Leu Glu Ile Lys Arg  
245

<210> 10

<211> 257

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Met Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu  
1 5 10 15

Leu His Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys  
20 25 30

Pro Gly Thr Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe  
35 40 45

Thr Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu  
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn  
65 70 75 80

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

10

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

ES 2 743 738 T3

100 105 110  
 Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 115 120 125  
 Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 130 135 140  
 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met  
 145 150 155 160  
 Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Ile Cys Lys Ala Ser Gln  
 165 170 175  
 Asp Val Gly Thr Ala Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 180 185 190  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro  
 195 200 205  
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 210 215 220  
 Thr Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr  
 225 230 235 240  
 Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Met Leu Asp Leu Lys  
 245 250 255

Arg

<210> 11  
 <211> 412  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 His Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro  
 20 25 30  
 Gly Thr Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
 35 40 45  
 10 Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu



ES 2 743 738 T3

50															
Trp 65	Ile	Gly	Asn	Ile	Asn 70	Pro	Asn	Asn	Gly	Gly 75	Thr	Thr	Tyr	Asn	Gln 80
Lys	Phe	Glu	Asp	Lys 85	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp 90	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr 95
Ala	Tyr	Met	Glu 100	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr 105	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr 110
Tyr	Cys	Ala 115	Ala	Gly	Trp	Asn	Phe	Asp 120	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr 125
Val	Thr 130	Val	Ser	Ser	Gly	Gly 135	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
Gly 145	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile 150	Val	Met	Thr	Gln	Ser 155	His	Lys	Phe	Met	Ser 160
Thr	Ser	Val	Gly	Asp 165	Arg	Val	Ser	Ile	Ile 170	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp 175
Val	Gly	Thr 180	Ala	Val	Asp	Trp	Tyr	Gln 185	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro 190
Lys	Leu	Leu 195	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr 200	Arg	His	Thr	Gly	Val	Pro	Asp 205
Arg 210	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr 215	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Thr 220
Asn 225	Val	Gln	Ser	Glu	Asp 230	Leu	Ala	Asp	Tyr	Phe 235	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn 240
Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr 245	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr 250	Met	Leu	Asp	Leu	Lys	Arg 255
Ala	Ala	Ala	Ile 260	Glu	Val	Met	Tyr	Pro 265	Pro	Pro	Tyr	Leu	Asp	Asn	Glu 270
Lys	Ser	Asn 275	Gly	Thr	Ile	Ile	His	Val 280	Lys	Gly	Lys	His	Leu	Cys	Pro 285
Ser 290	Pro	Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Ser	Lys 295	Pro	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val 300

ES 2 743 738 T3

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

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

Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr  
 340 345 350

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

Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln  
 370 375 380

Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser  
 385 390 395 400

Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu  
 405 410

## REIVINDICACIONES

1. Célula inmunosensible que comprende:
- 5 (a) un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une a un primer antígeno y que tras su unión a dicho primer antígeno puede suministrar una señal de activación a la célula inmunosensible, CAR que se une a dicho primer antígeno con una constante de disociación ( $K_d$ ) de  $1 \times 10^{-8}$  M o más, mediante lo cual dicha célula inmunosensible muestra actividad citolítica sustancialmente nula o despreciable contra células que son positivas de manera individual para dicho primer antígeno, y
- 10 (b) un receptor coestimulante quimérico (CCR) que se une a un segundo antígeno que es diferente del primer antígeno y que tras su unión a dicho segundo antígeno puede suministrar una señal coestimulante a la célula inmunosensible,
- 15 mediante lo cual la célula inmunosensible muestra un mayor grado de actividad citolítica contra células que son positivas tanto para el primer antígeno como para el segundo antígeno en comparación con células que son positivas de manera individual para el primer antígeno.
2. Célula inmunosensible según la reivindicación 1, en la que la célula se selecciona del grupo que consiste en una célula T, un linfocito citolítico natural (NK), un linfocito T citotóxico (CTL), una célula T reguladora, una célula madre embrionaria humana, y una célula madre pluripotente a partir de la cual pueden diferenciarse células linfoides.
- 20 3. Célula inmunosensible según la reivindicación 1 o 2, en la que el antígeno es un antígeno tumoral o de patógeno.
- 25 4. Célula inmunosensible según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicho CAR se une al primer antígeno con una constante de disociación ( $K_d$ ) de  $5 \times 10^{-8}$  M o más,  $1 \times 10^{-7}$  M o más, o  $1 \times 10^{-6}$  M o más.
- 30 5. Célula inmunosensible según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que dicho CAR se expresa de manera recombinante.
6. Célula inmunosensible según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el CAR se expresa a partir de un vector y/o en la que el CCR se expresa a partir de un vector.
- 35 7. Célula inmunosensible según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dichos antígenos primero y segundo se seleccionan del grupo que consiste en PSCA, CAIX, CEA, CDS, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD133, CD138, un antígeno de citomegalovirus (CMV), EGP-2, EGP-40, EpCAM, erb-B2, erb-B3, erb-B4, FBP, receptor de acetilcolina fetal, receptor de folato-a, GD2, GD3, HER-2, hTERT, IL-13R-a2, KDR, LeY, molécula de adhesión celular LI, MAGE-A1, MUC1, mesotelina, ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, antígeno oncofetal (h5T4), PSMA, ROR1, TAG-72, VEGF-R2, y WT-1.
- 40 8. Célula inmunosensible según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que dichos antígenos primero y segundo son:
- 45 (a) CD10 y CD19, respectivamente;
- (b) CD56 y CD138, respectivamente;
- 50 (c) se seleccionan del grupo que consiste en CD133, un antígeno de citomegalovirus (CMV), erb-B2, KDR, mesotelina, ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, antígeno oncofetal (h5T4), PSCA, PSMA, CD19, VEGF-R2, y WT-1;
- 55 (d) se seleccionan del grupo que consiste en mesotelina, receptor de folato-a, CD44, y CD133; o
- (e) PSCA y PSMA, respectivamente.
9. Célula inmunosensible según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el dominio de señalización intracelular de dicho CAR es un dominio de señalización de cadena CD3.
- 60 10. Célula inmunosensible según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el dominio de señalización intracelular del CCR es un dominio de señalización de CD97, CA11a-CD18, CD2, ICOS, CD27, CD154, CD5, OX40, 4-1BB o CD28.
- 65 11. Célula inmunosensible según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que el CAR comprende un

dominio de señalización de cadena CD3 y un dominio de unión extracelular que se une a PSCA.

- 5 12. Célula inmunosensible según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que el CAR se une al primer antígeno con una afinidad de unión que es inferior en comparación con la afinidad de unión con la que el CCR se une al segundo antígeno.
- 10 13. Método para producir *in vitro* una célula inmunosensible específica de antígeno, comprendiendo el método:  
 introducir en la célula inmunosensible una primera secuencia de nucleótidos que codifica para un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une a un primer antígeno y que tras la unión al primer antígeno puede suministrar una señal de activación a la célula inmunosensible, CAR que se une a dicho primer antígeno con una constante de disociación ( $K_d$ ) de  $1 \times 10^{-8}$  M o más, mediante lo cual dicha célula inmunosensible muestra actividad citolítica sustancialmente nula o despreciable contra células que son positivas de manera individual para dicho primer antígeno; e  
 15 introducir en la célula inmunosensible una segunda secuencia de nucleótidos que codifica para un receptor coestimulante quimérico (CCR) que se une a un segundo antígeno que es diferente del primer antígeno y que tras la unión al segundo antígeno puede suministrar una señal coestimulante a la célula inmunosensible,  
 20 mediante lo cual la célula inmunosensible muestra un mayor grado de actividad citolítica contra células que son positivas para los antígenos tanto primero como segundo en comparación con células que son positivas de manera individual para el primer antígeno.
- 25 14. Composición farmacéutica que comprende una célula inmunosensible según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 15. Célula inmunosensible según cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para su uso en el tratamiento o la prevención de un neoplasma, o la inducción de muerte de células tumorales en un sujeto.
- 35 16. Célula inmunosensible para su uso según la reivindicación 15, en la que dicha inducción de muerte de células tumorales reduce el número de células tumorales, reduce el tamaño tumoral y/o erradica el tumor, y/o en la que dicho tratamiento o prevención reduce o erradica la carga tumoral en el sujeto.
- 40 17. Célula inmunosensible para su uso según la reivindicación 15 o 16, en la que dicho neoplasma se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de mama, leucemia de células B, mieloma múltiple y cáncer de ovarios.
- 45 18. Célula T para su uso en el tratamiento de cáncer de próstata, en la que la célula T comprende:  
 un receptor de antígeno quimérico que se une a PSCA y que tras la unión a PSCA puede activar la célula T, CAR que se une a PSCA con una constante de disociación ( $K_d$ ) de  $1 \times 10^{-8}$  M o más, mediante lo cual dicha célula T muestra actividad citolítica sustancialmente nula o despreciable contra células que son positivas de manera individual para PSCA, y  
 un receptor coestimulante quimérico (CCR) que se une a PSMA y que tras la unión a PSMA puede suministrar una señal coestimulante a la célula T,  
 mediante lo cual la célula T muestra un mayor grado de actividad citolítica contra células que son positivas tanto para PSCA como para PSMA en comparación con células que son positivas de manera individual para PSCA.
- 50

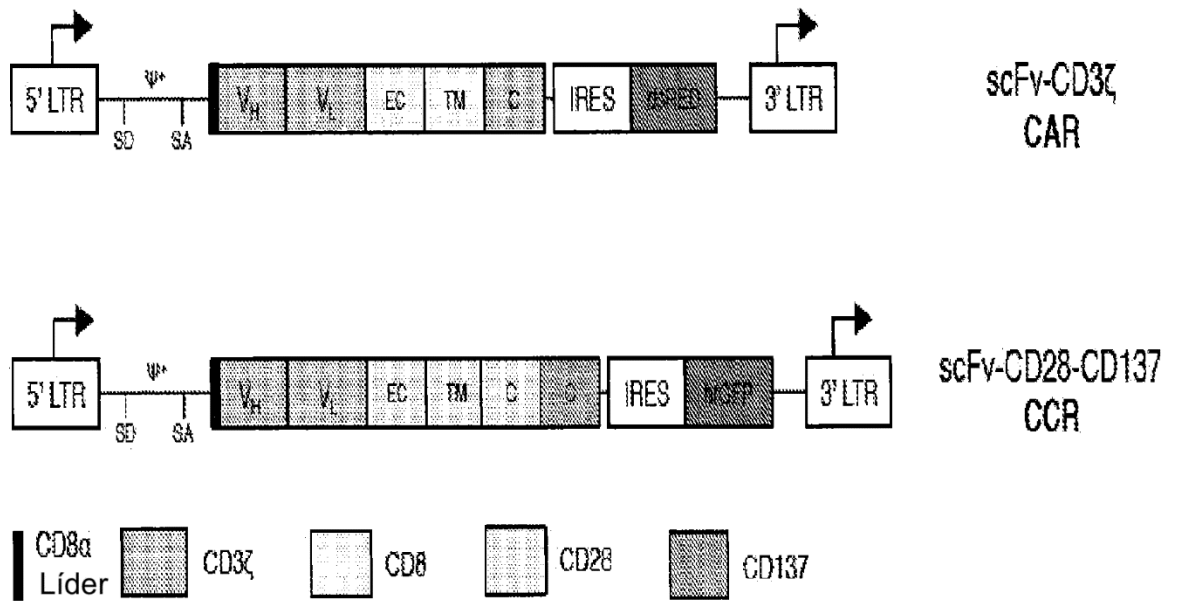


Figura 1A

Grupos de células T

1. Simulado

2. 19z1

3. P28BB

4. 19z1 +  
P28BB

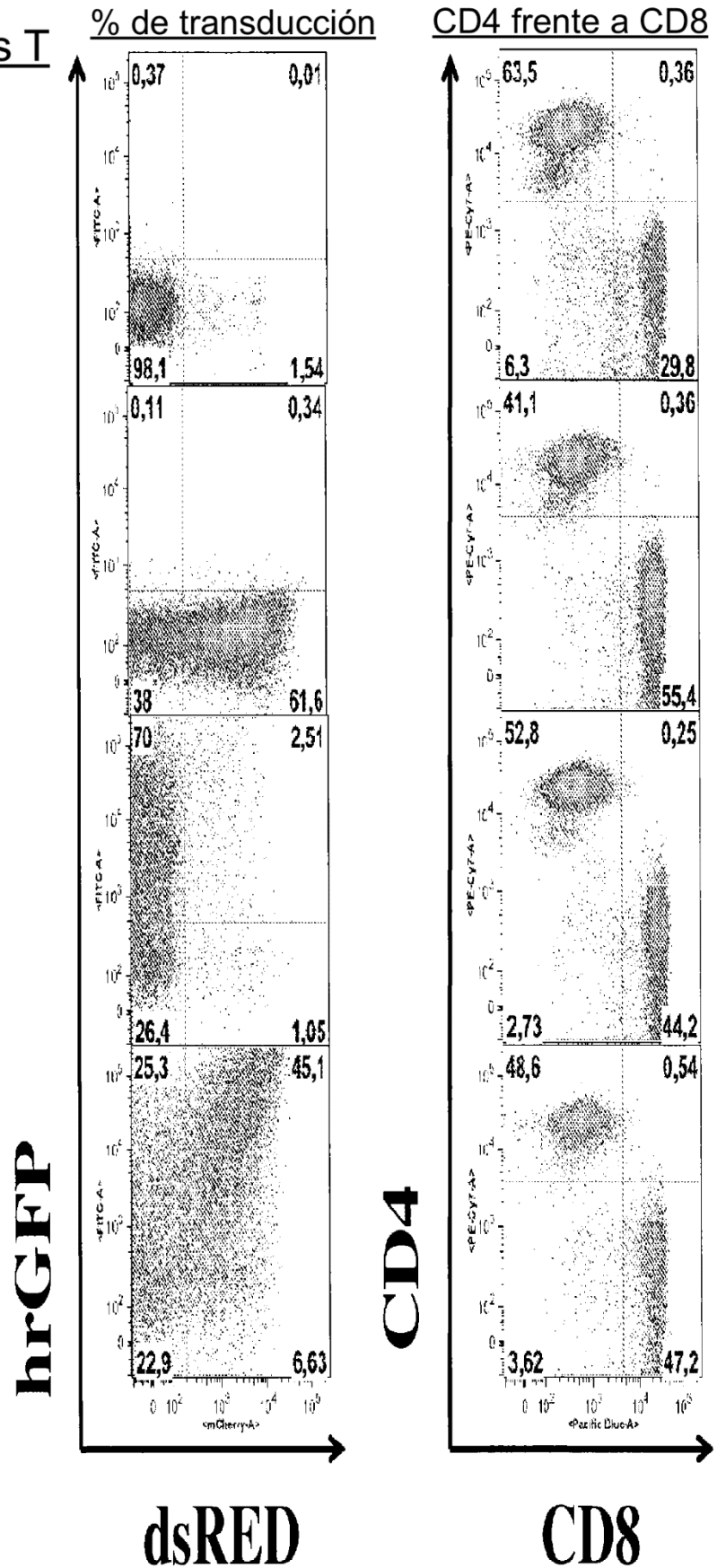


Figura 1B

Transducción de CTL con CAR diferentes y múltiples

<u>Grupos de células T</u>	<u>Transducción retroviral de SFG</u>									
1. Simulado	N/A									
2. 19z1	<table border="1"> <tr> <td><math>\alpha</math>-CD19 – CD8-CD3zeta</td> <td>IRES</td> <td>dsRED</td> </tr> </table>	$\alpha$ -CD19 – CD8-CD3zeta	IRES	dsRED						
$\alpha$ -CD19 – CD8-CD3zeta	IRES	dsRED								
3. P28BB	<table border="1"> <tr> <td><math>\alpha</math>-PSMA – CD28 – 4-1BB</td> <td>IRES</td> <td>hrGFP</td> </tr> </table>	$\alpha$ -PSMA – CD28 – 4-1BB	IRES	hrGFP						
$\alpha$ -PSMA – CD28 – 4-1BB	IRES	hrGFP								
4. 19z1 + P28BB	<table border="1"> <tr> <td><math>\alpha</math>-CD19 – CD8-CD3zeta</td> <td>IRES</td> <td>dsRED</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">+</td> </tr> <tr> <td><math>\alpha</math>-PSMA – CD28 – 4-1BB</td> <td>IRES</td> <td>hrGFP</td> </tr> </table>	$\alpha$ -CD19 – CD8-CD3zeta	IRES	dsRED	+			$\alpha$ -PSMA – CD28 – 4-1BB	IRES	hrGFP
$\alpha$ -CD19 – CD8-CD3zeta	IRES	dsRED								
+										
$\alpha$ -PSMA – CD28 – 4-1BB	IRES	hrGFP								

Figura 1C

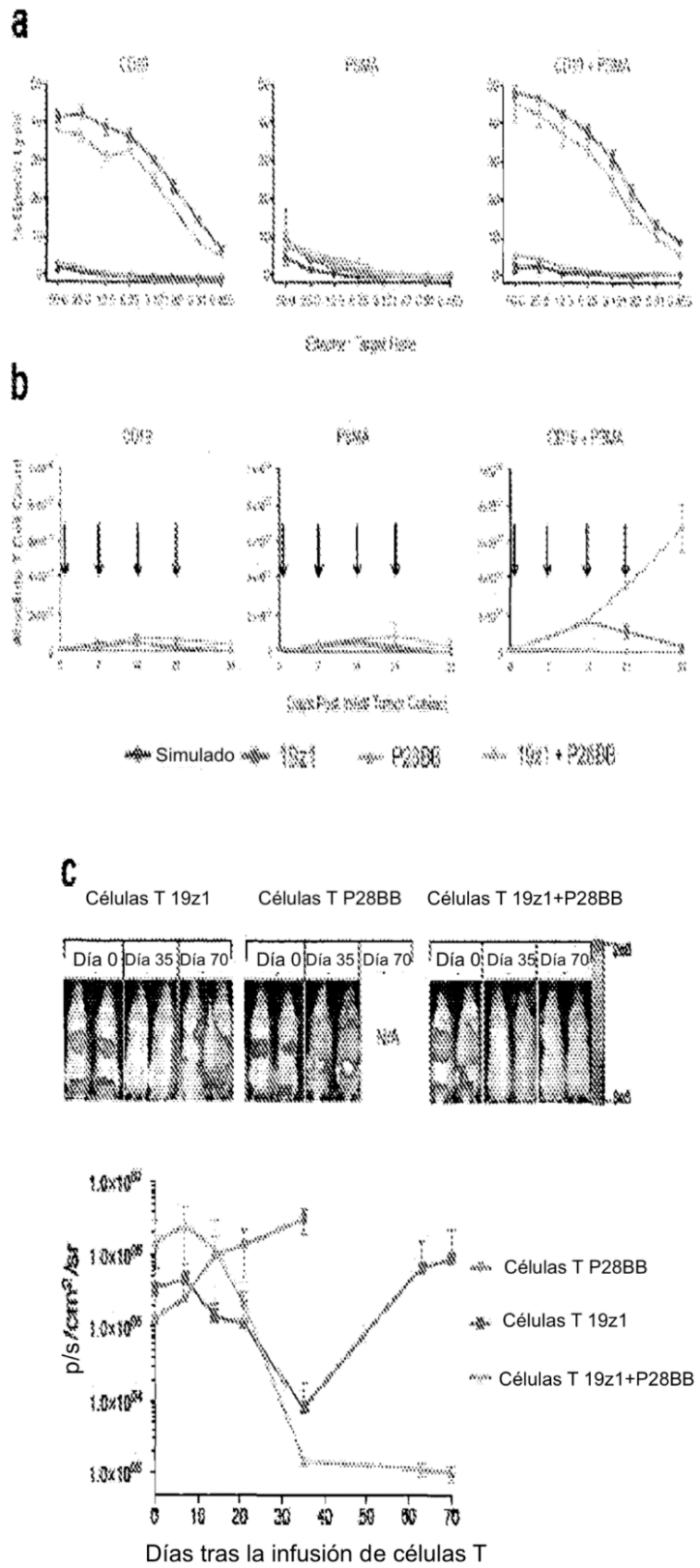


Figura 2



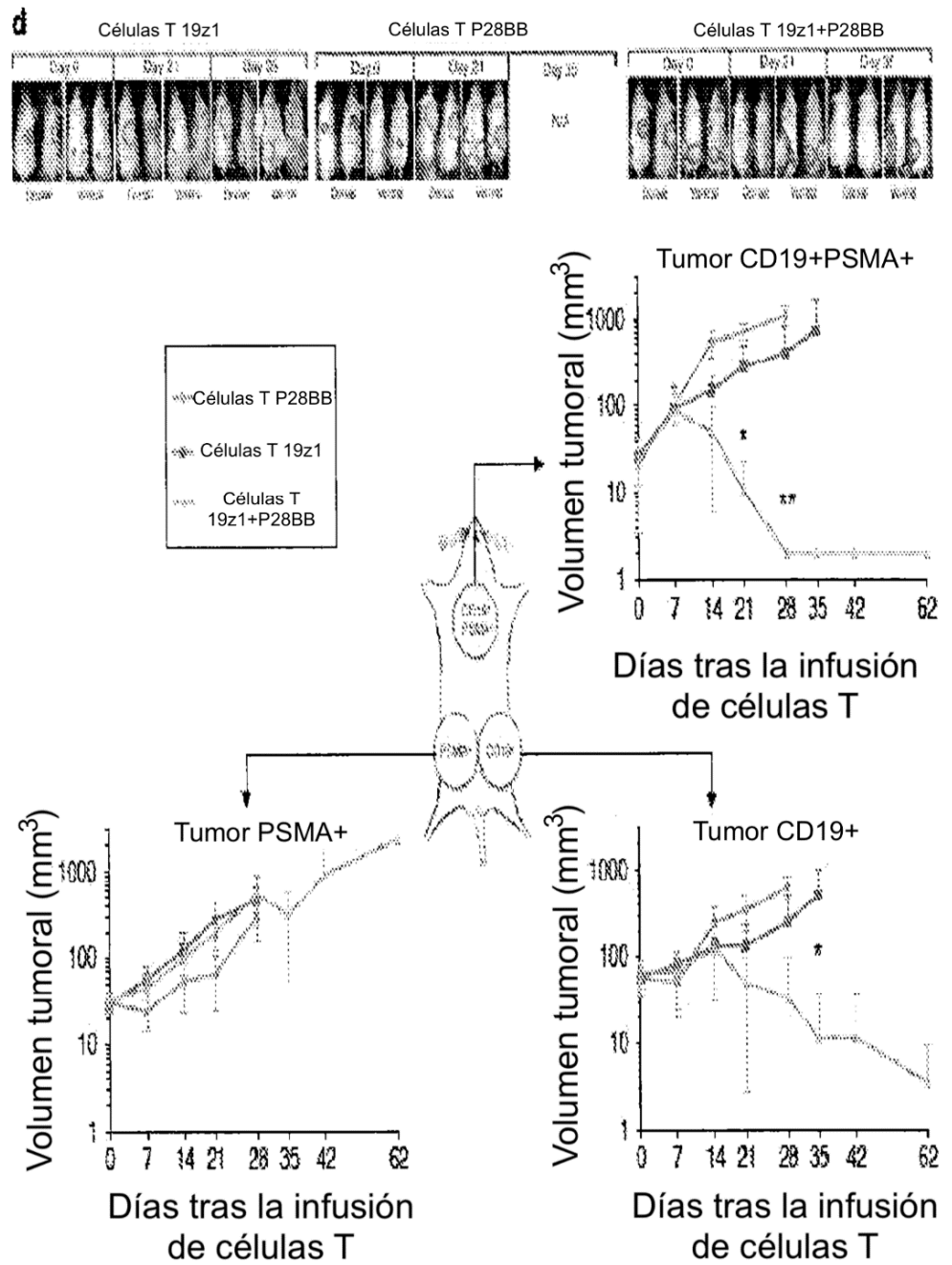


Figura 2  
Continuación

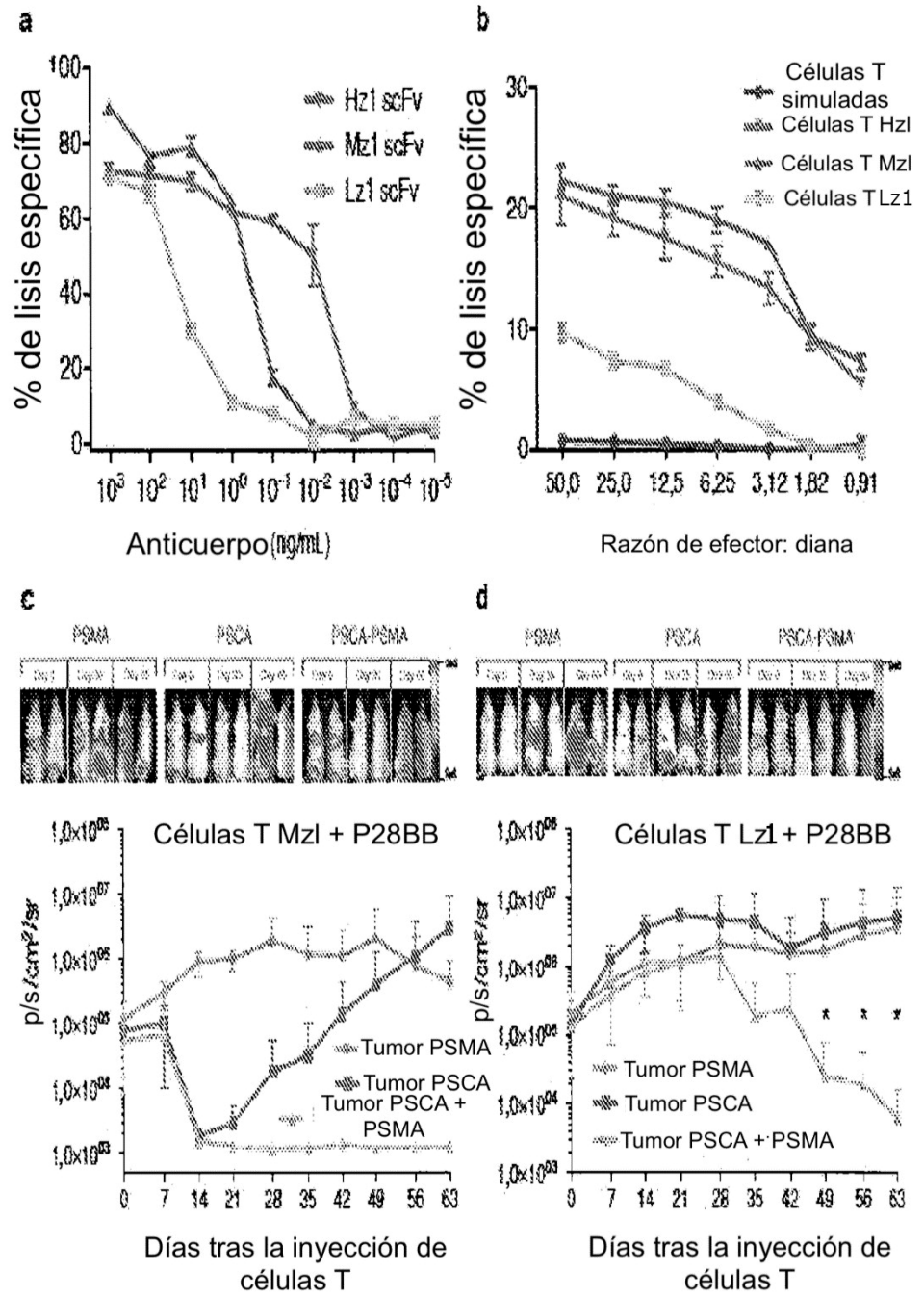


Figura 3

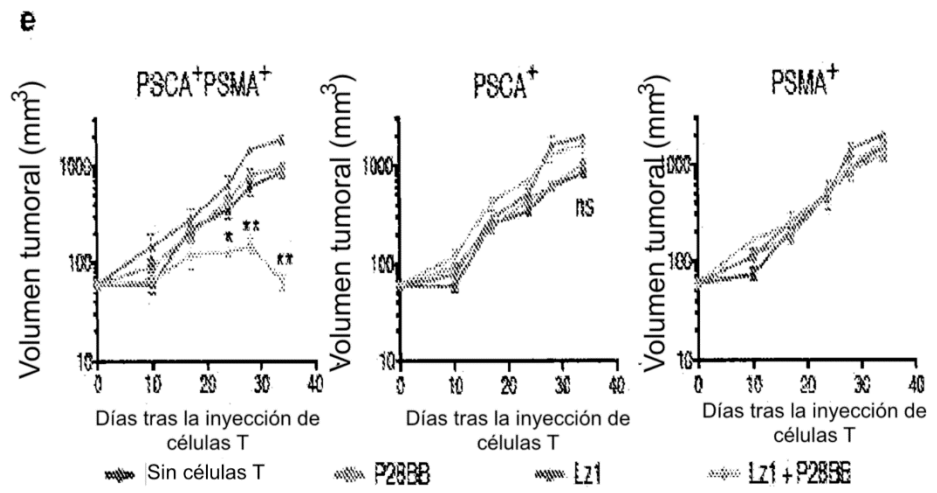


Figura 3  
Continuación

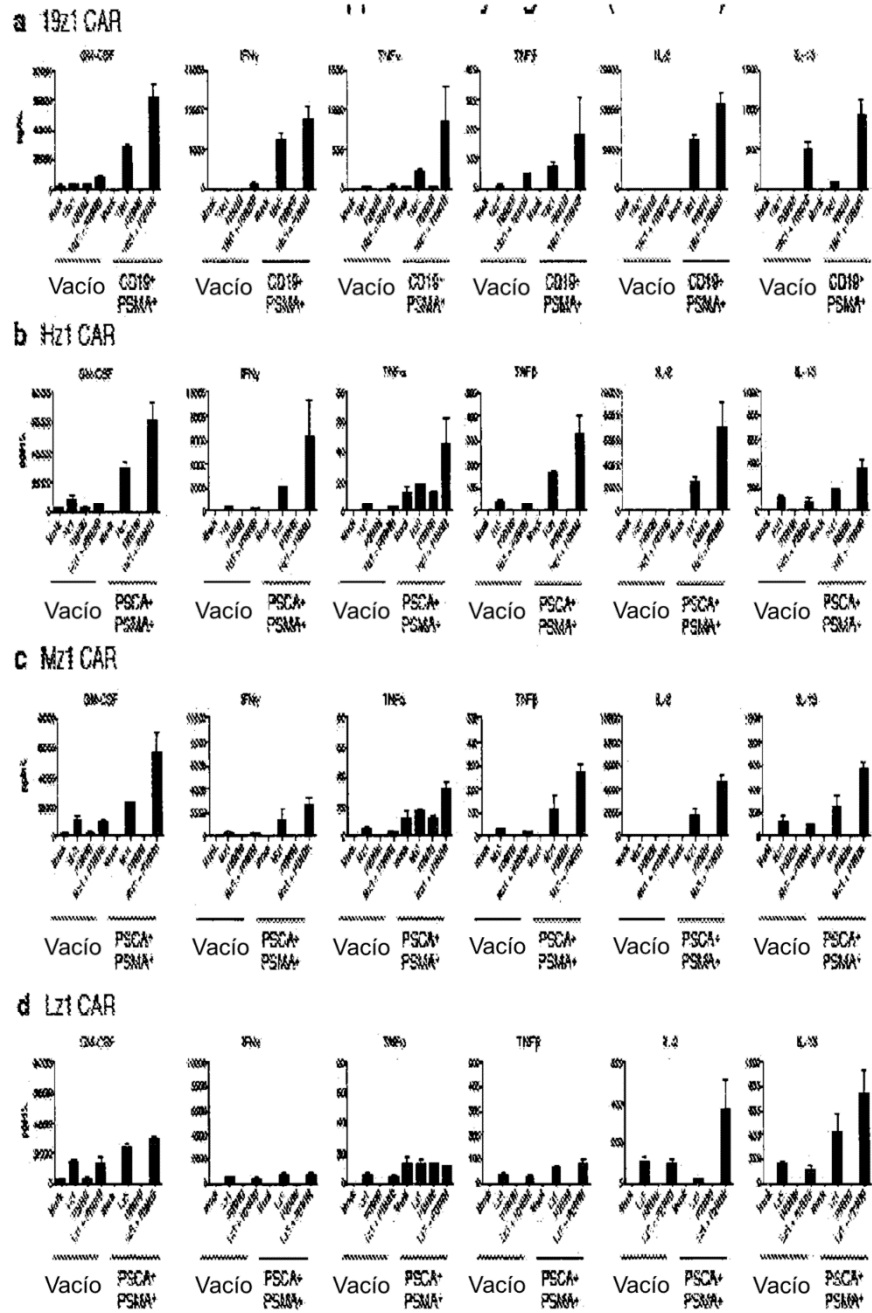


Figura 4

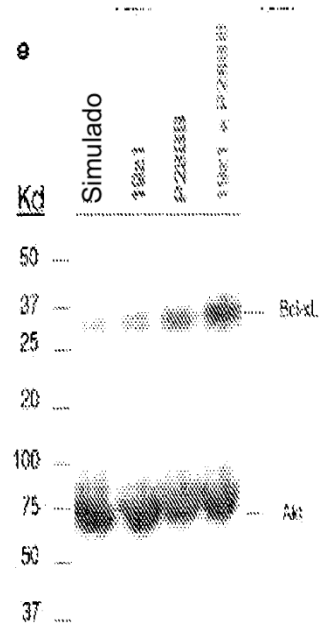


Figura 4  
Continuación

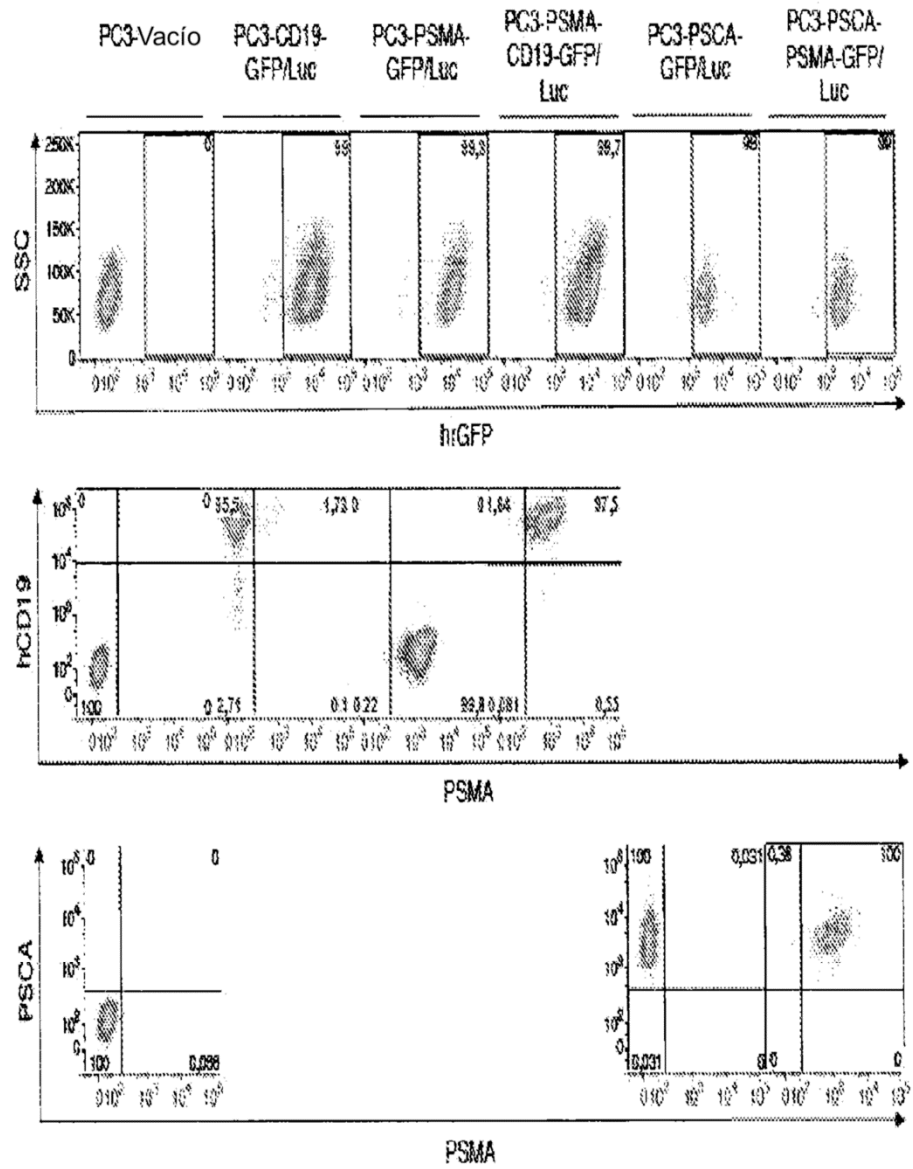


Figura 5

a Estrategia de reconocimiento de antígeno doble de señal dividida

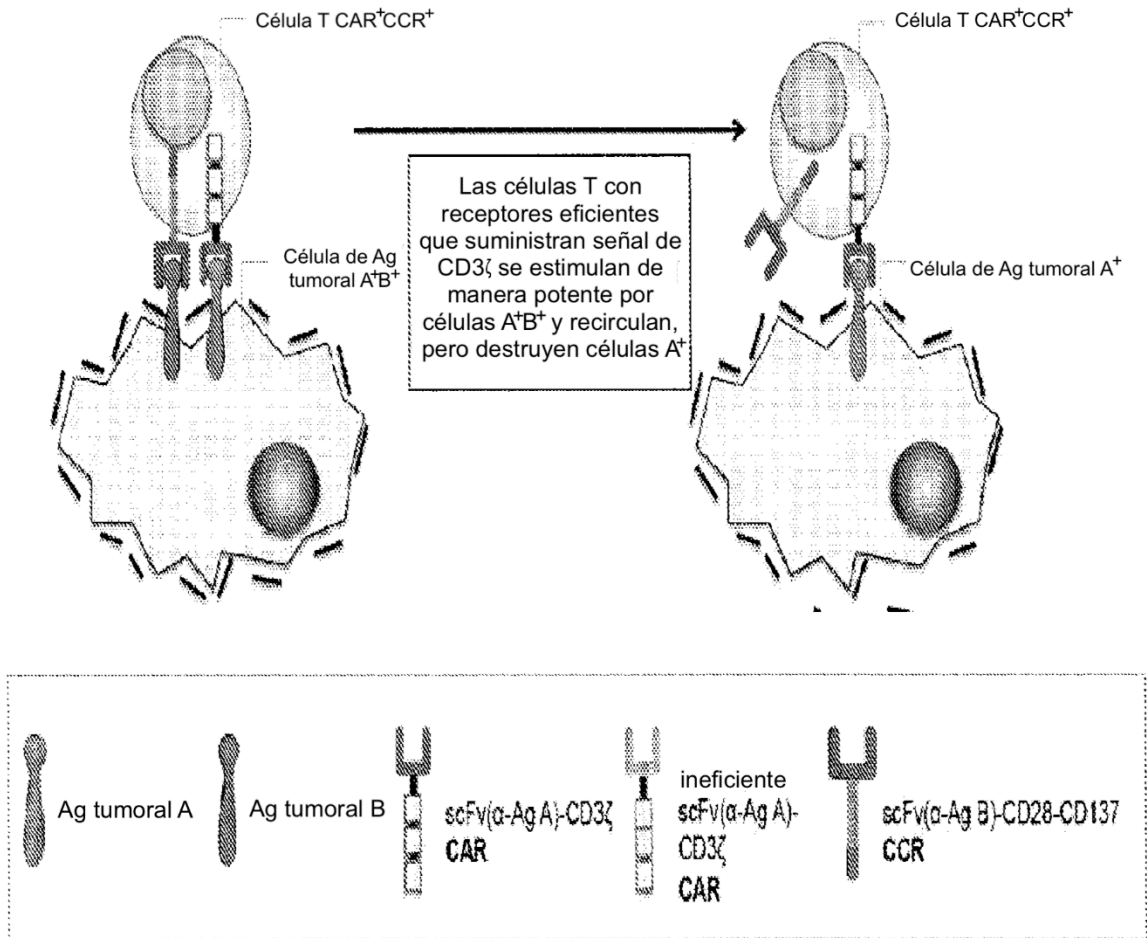


Figura 6A

**b** Estrategia de células T que detectan tumores

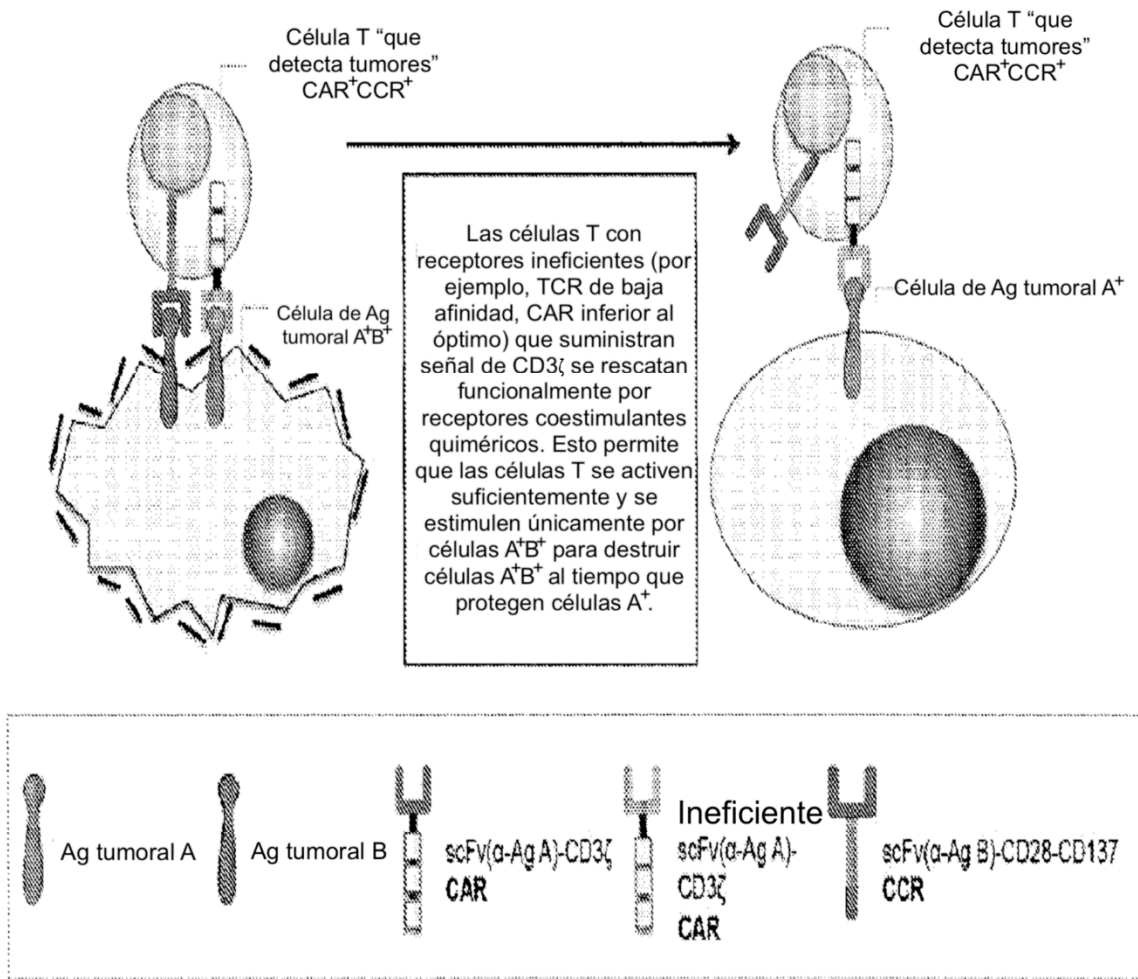


Figura 6B



# Activación y estimulación de CAR doble

