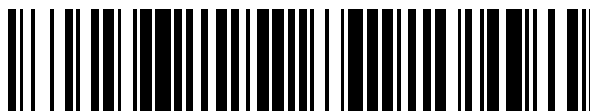


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 398**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28	(2006.01)
C07K 16/32	(2006.01)
C12N 5/0783	(2010.01)
A61K 39/00	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)
A01N 63/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2014 PCT/US2014/015113**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.08.2014 WO14124143**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2014 E 14749306 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 2953475**

54 Título: **Linfocitos T modificados con especificidad mejorada**

30 Prioridad:

06.02.2013 US 201361761548 P

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

16.03.2020

73 Titular/es:

**CELGENE CORPORATION (100.0%)
86 Morris Avenue
Summit, NJ 07901, US**

72 Inventor/es:

**LIANG, BITAO;
ABBOT, STEWART y
LIU, WEI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 748 398 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

Linfocitos T modificados con especificidad mejorada

1. Campo

5 La descripción en la presente memoria se refiere al campo de la inmunología, y más específicamente, a la modificación de linfocitos T u otras células inmunitarias.

2. Antecedentes

10 Las células del sistema inmunitario, tales como los linfocitos T (también conocidos como células T), reconocen e interactúan con antígenos específicos a través de receptores o complejos receptores que, tras el reconocimiento o la interacción con tales antígenos, provocan la activación de la célula. Un ejemplo de tal receptor es el complejo receptor de linfocitos T específico de antígeno (TCR/CD3), un complejo de ocho proteínas. El receptor de células T (TCR) se expresa sobre la superficie de los linfocitos T. Un componente, CD3, que tiene una estructura invariable, es responsable de la señalización intracelular después de la ocupación de TCR por el ligando. El receptor de linfocitos T para el complejo antígeno-CD3 (TCR/CD3) reconoce los péptidos antigénicos que le presentan las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Los complejos de MHC y péptido se expresan sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno y otras dianas de linfocitos T. La estimulación del complejo TCR/CD3 da como resultado la activación del linfocito T y la consiguiente respuesta inmunitaria específica de antígeno. El complejo TCR/CD3 juega un papel central en la función efectora y la regulación del sistema inmunológico.

20 Los linfocitos T requieren una segunda señal coestimuladora para volverse completamente activos. Sin semejante señal, los linfocitos T no responden a la unión del antígeno al TCR o se vuelven anérgicos. Tal señal coestimuladora, por ejemplo, es proporcionada por CD28, una proteína de linfocitos T, que interactúa con CD80 y CD86 sobre las células productoras de antígeno. ICOS (del inglés Inducible COStimulator "coestimulador inducible"), otra proteína de linfocitos T, proporciona una señal coestimuladora cuando se une al ligando de ICOS.

25 Las funciones esenciales de unión a antígeno, señalización y estimulación del complejo TCR se han reducido mediante métodos de recombinación genética a una única cadena de polipéptido, generalmente denominada Receptor de Antígeno Quimérico (CAR). Véase, *p. ej.*, Eshhar, Patente de Estados Unidos Núm. 7.741.465; Eshhar, Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2012/0093842. Los linfocitos T que portan tales CAR se denominan generalmente linfocitos CAR-T. Sin embargo, si bien estos CAR dirigen eficazmente los linfocitos T a antígenos específicos asociados a tumores o antígenos específicos de tumores, y pueden dirigir eficazmente los linfocitos T para destruir las células tumorales que expresan tales antígenos, tal diseño adolece del grave efecto secundario de dirigir los linfocitos T a la destrucción de células normales, sanas que también expresan tales antígenos. Como tal, el uso de tales linfocitos CAR-T generalmente está restringido a tumores que expresan un antígeno no expresado por ninguna otra célula en el organismo, una circunstancia relativamente rara.

30 En la presente memoria se describen linfocitos T modificados que comprenden receptores quiméricos que superan esta limitación del diseño actual de CAR.

35 Kloss et al. (Nat. Biotechnol. enero 2013; 31(1):71-5. doi: 10.1038/nbt.2459) describen células T que se "transducen con un CAR que proporciona una activación subóptima tras la unión de un antígeno" (en particular, un CAR anti-CD 19 o anti-PSCA que comprende un dominio de señalización CD3ζ) y "un receptor coestimulador quimérico (CCR) que reconoce un segundo antígeno" (en particular, un CCR anti-PSMA que comprende dominios coestimuladores de CD28 y 4-1BB).

40 Wilkie et al. (J. Clin. Immunol. octubre 2012; 32(5):1059-70. doi: 10.1007/s10875-012-9689-9) describen células T "de doble direccionamiento" que expresan simultáneamente "un CAR específico de Erb2 y MUC1 que señalizan utilizando CD3ζ y CD28, respectivamente".

45 La disertación de Riet presentada en 2010 (<https://kups.ub.uni-koeln.de/3261/1/Dissertation-TobiasRiet.pdf>) describe "linfocitos T con expresión simultánea de dos CAR con diferentes especificidades" (en particular, CAR específicos para Erb2 y CEA). "Las células T biespecíficas ofrecieron una selectividad significativamente mejorada para los antígenos expresados simultáneamente, aumentando la activación de las células T mediante la unión del segundo antígeno. Al mismo tiempo, se aumentó el umbral de activación de las células T biespecíficas, de modo que las células con una baja expresión de antígeno ya no fueron reconocidas".

50 Duong et al. (Immunotherapy. enero 2011;3(1):33-48. doi: 10.2217/imt.10.81) describen células T "transducidas dobles" que contienen un "CAR específico para FBP ... compuesto por un scFv conectado a la bisagra de CD28 humana y dominios transmembrana al dominio citoplasmático de la cadena de señalización y de FcεRI" y un "CAR específico para ErbB-2 ... compuesto por un scFv conectado a través de la región bisagra de CD8 y la región transmembrana de CD28, a los dominios citoplasmáticos de CD28 y CD3-ζ en tándem".

3. Compendio

En un aspecto, la invención proporciona un linfocito T modificado que comprende: un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, y un primer dominio de señalización intracelular, en donde dicho primer polipéptido no comprende un dominio coestimulador, en donde dicho primer dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de polipéptido que comprende un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM), en donde dicha secuencia de polipéptido es preferiblemente un dominio de señalización CD3 ζ , y en donde dicho primer antígeno es: (i) un antígeno sobre una célula tumoral, en donde dicha célula tumoral es preferiblemente una célula en un tumor sólido; o (ii) un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor; y un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, o un receptor que se une a dicho segundo antígeno; y un segundo dominio de señalización intracelular, en donde dicho segundo polipéptido comprende uno o más dominios coestimuladores, en donde dicho segundo antígeno es un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); y en donde dichos uno o más dominios coestimuladores comprenden una o más de una secuencia de polipéptido CD27 coestimulador, una secuencia de polipéptido CD28 coestimulador, una secuencia de polipéptido OX40 coestimulador (CD134), una secuencia de polipéptido 4-1BB coestimulador (CD137), o una secuencia de polipéptido coestimulador de células T inducible por coestimulador (ICOS); y en donde dicho linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico solamente cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

En una realización, dicho antígeno asociado a tumor o antígeno específico de tumor es Her2, antígeno de células madre de próstata (PSCA), PSMA, BCMA, alfafetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de cáncer-125 (CA-125), CA19-9, calretinina, MUC-1, proteína de membrana epitelial (EMA), antígeno tumoral epitelial (ETA), tirosinasa, antígeno asociado a melanoma (MAGE), CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína del fluido de la enfermedad quística macroscópica (GCDFFP-15), antígeno HMB-45, proteína melan-A (antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T; MART-1), mio-D1, actina específica del músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo 1, la forma dimérica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (M2-PK tumoral), CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRvIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteína, TARP (proteína de marco de lectura alternativo del receptor gamma de células T), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial con seis dominios transmembrana de próstata 1), una proteína ras anormal o una proteína p53 anormal.

En otra realización, dicho primer dominio de unión a antígeno y dicho segundo dominio de unión a antígeno son independientemente una porción de unión a antígeno de un receptor o una porción de unión a antígeno de un anticuerpo. En otra realización, el primer dominio de unión a antígeno y dicho segundo dominio de unión a antígeno son independientemente un fragmento de anticuerpo scFv.

En otra realización, dicho primer polipéptido comprende un dominio de señalización CD3 ζ .

En otra realización, dicho primer polipéptido y/o dicho segundo polipéptido comprenden un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-7 (IL-7R), un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-12, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-15, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-21, o un dominio de señalización intracelular del receptor del factor de crecimiento transformante β (TGF β).

En otra realización, dicho primer polipéptido comprende un dominio de señalización CD3 ζ , y en donde dicho segundo polipéptido comprende un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-7.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un linfocito T modificado que comprende:

un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, y un primer dominio de señalización intracelular, en donde dicho primer polipéptido comprende uno o más dominios coestimuladores, en donde dicho primer antígeno es: (i) un antígeno sobre una célula tumoral, en donde dicha célula tumoral es preferiblemente una célula en un tumor sólido; o (ii) un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor; y en donde dichos uno o más dominios coestimuladores comprenden una o más de una secuencia de polipéptido CD27 coestimulador, una secuencia de polipéptido CD28 coestimulador, una secuencia de polipéptido OX40 coestimulador (CD134), una secuencia de polipéptido 4-1BB coestimulador (CD137), o una secuencia de polipéptido coestimulador de células T inducible por coestimulador (ICOS); y un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, o un receptor que se une a dicho segundo antígeno; y un segundo dominio de señalización intracelular, en donde dicho segundo polipéptido no comprende un dominio coestimulador, en donde dicho segundo antígeno es un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); y en donde dicho segundo dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de polipéptido que comprende un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM), en el que dicha secuencia de polipéptido es preferiblemente un dominio de señalización CD3 ζ , y en donde dicho linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico solo cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho

segundo antígeno, respectivamente.

5 En una realización, dicho antígeno asociado a tumor o antígeno específico de tumor es Her2, antígeno de células madre de próstata (PSCA), PSMA, BCMA, alfafetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de cáncer-125 (CA-125), CA19-9, calretinina, MUC-1, proteína de membrana epitelial (EMA), antígeno tumoral epitelial (ETA), tirosinasa, antígeno asociado a melanoma (MAGE), CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína del fluido de la enfermedad quística macroscópica (GCDFP-15), antígeno HMB-45, proteína melan-A (antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T; MART-1), mio-D1, actina específica del músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo 1, la forma dimérica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (M2-PK tumoral), CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRvIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteína, TARP (proteína de marco de lectura alternativo del receptor gamma de células T), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial con seis dominios transmembrana de próstata 1), una proteína ras anormal o una proteína p53 anormal.

10 En otra realización, dicho primer dominio de unión a antígeno y dicho segundo dominio de unión a antígeno son independientemente una porción de unión a antígeno de un receptor o una porción de unión a antígeno de un anticuerpo. En otra realización, dicho primer dominio de unión a antígeno y dicho segundo dominio de unión a antígeno son independientemente un fragmento de anticuerpo scFv.

En otra realización, dicho segundo polipéptido comprende un dominio de señalización CD3ζ.

20 En otra realización, dicho primer polipéptido y/o dicho segundo polipéptido comprenden un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-7 (IL-7R), un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-12, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-15, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-21, o un dominio de señalización intracelular del receptor del factor de crecimiento transformante β (TGFβ). En otra realización, dicho primer polipéptido comprende un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-7; y dicho segundo polipéptido comprende un dominio de señalización CD3ζ.

25 Se proporcionan en la presente memoria linfocitos modificados, p. ej., linfocitos T modificados que comprenden al menos dos polipéptidos diferentes, p. ej., receptores quiméricos, en los que la señal inmunitaria derivada de la unión de un primer polipéptido, p. ej., receptor quimérico, a un primer antígeno se separa de una señal coestimuladora producida por un segundo polipéptido, p. ej., receptores quiméricos, y en donde la señal coestimuladora depende de la unión al antígeno de un segundo antígeno a los segundos receptores quiméricos. Como se emplea en toda la presente memoria, "primer polipéptido" indica el polipéptido que genera la señal inmunitaria de unión a antígeno primaria, y el "segundo polipéptido" es el polipéptido que genera la señal inmunitaria coestimuladora. En ciertos casos, los dos polipéptidos (p. ej., receptores quiméricos) se introducen en los linfocitos T modificados utilizando una sola construcción CAR, con los polipéptidos separados por una secuencia escindible (T2A o P2A) que permite la expresión de dos polipéptidos discretos (en cantidades esencialmente iguales) de un solo ORF.

30 En la presente memoria se describe un linfocito T modificado (linfocito CAR-T) que comprende un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno y un primer dominio de señalización intracelular, en donde dicho primer polipéptido no comprende un dominio coestimulador; y un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, o un receptor que se une a dicho segundo antígeno; y un segundo dominio de señalización intracelular; en donde dicho linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico solo cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente. En una realización específica, la unión de dicho primer antígeno a dicho primer dominio de unión al antígeno sin unión de dicho segundo antígeno a dicho segundo dominio de unión, o la unión de dicho segundo antígeno a dicho segundo dominio de unión al antígeno sin unión del primer segundo antígeno a dicha primera unión dominio, induce una anergia de dicho linfocito T modificado, o la falta de respuesta de dicho linfocito T a dicho primer antígeno o dicho segundo antígeno.

40 En otra realización específica, dicho primer dominio de unión a antígeno y dicho segundo dominio de unión a antígeno son independientemente una porción de unión a antígeno de un receptor, una porción de unión a antígeno de un anticuerpo u otro agente de unión a antígeno macromolecular basado en péptidos. En ciertas realizaciones específicas, uno o ambos de dicho primer dominio de unión a antígeno o dicho segundo dominio de unión a antígeno son fragmentos de anticuerpo scFv. En realizaciones específicas, uno o ambos de dicho primer polipéptido o dicho segundo polipéptido comprenden adicionalmente un dominio transmembrana. En otras realizaciones específicas, dicho primer polipéptido o dicho segundo polipéptido comprenden un motivo de supervivencia de células T. En una realización específica, el motivo de supervivencia de células T es un motivo de supervivencia de células T CD28. En otras realizaciones específicas, dicho motivo de supervivencia de células T es un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-7 (IL-7R), un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-12, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-15, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-21, o un dominio de señalización intracelular del receptor del factor de crecimiento transformante β (TGFβ). En otra realización más específica, dicho primer polipéptido o dicho segundo polipéptido comprenden una porción de una

molécula CD28 que comprende un motivo de supervivencia de células T. En una realización más específica, dicho primer polipéptido o dicho segundo polipéptido comprenden una molécula CD28 que comprende un motivo de supervivencia de células T. En ciertas realizaciones específicas, dicho primer dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de polipéptido que comprende un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM). En una realización más específica, dicha secuencia de polipéptido es un dominio de señalización CD3 ζ .

Proporcionado en la presente memoria, dicho primer antígeno puede ser un antígeno sobre una célula tumoral. En una realización, dicha célula tumoral es una célula en un tumor sólido. En otra realización, dicha célula tumoral es una célula de cáncer de sangre. Proporcionado en la presente memoria, dicho primer antígeno también puede ser un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor. En realizaciones específicas, dicho antígeno asociado a tumor o antígeno específico de tumor es Her2, antígeno de células madre de próstata (PSCA), PSMA (antígeno de membrana específico de próstata), antígeno de maduración de células B (BCMA), alfafetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de cáncer-125 (CA-125), CA19-9, calretinina, MUC-1, proteína de membrana epitelial (EMA), antígeno tumoral epitelial (ETA), tirosinasa, antígeno asociado a melanoma (MAGE), CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína del fluido de la enfermedad quística macroscópica (GCDFP-15), antígeno HMB-45, proteína melan-A (antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T; MART-1), mio-D1, actina específica de músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo 1, la forma dimerica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (M2-PK tumoral), CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EphA2, CSPG4, CD138, FAP (Proteína de activación de Fibroblastos), CD171, kappa, lambda, 5T4, integrina $\alpha_v\beta_6$, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD123, EGFR, EGP2, EGP40, EpCAM, AchR fetal, FR α , GD3, HLA-A1 + MAGE1, HLA-A1 + NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, Lewis-Y, Muc16, NCAM, Ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, ROR1, Survivina, TAG72, TEM, VEGFR2, EGFRvIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteína, TARP (proteína de marco de lectura alternativo del receptor gamma de células T), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial con seis dominios transmembrana de próstata 1), una proteína ras anormal o una proteína p53 anormal. En una realización específica, dicho primer antígeno es PSCA. En otra realización específica, dicho primer antígeno es PSMA. En otra realización específica, dicho primer antígeno es BCMA. En otra realización específica, cuando dicho primer dominio de unión a antígeno es específico para HER2, el dominio de unión a antígeno del segundo polipéptido de la célula T modificada no es específico para MUC-1.

En otra realización específica, dicho primer antígeno es integrina $\alpha v\beta 3$ (CD61), galactina, K-Ras (oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2) o Ral-B.

En otro caso específico, dicho segundo antígeno es un factor de crecimiento, citocina o interleucina. En un caso particular, el segundo antígeno es una molécula, p. ej., un factor de crecimiento, citocina o interleucina, asociada con angiogénesis o vasculogénesis. En casos más específicos, dicho segundo antígeno es el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) o la interleucina-8 (IL-8). Por consiguiente, dicho segundo dominio de unión a antígeno puede ser, p. ej., un anticuerpo (o fragmento del mismo, p. ej., scFv) específico para, bFGF, PDGF, HGF, IGF o IL-8; o un receptor para bFGF, PDGF, HGF, IGF o IL-8. En un caso específico, dicho segundo dominio de unión a antígeno es un receptor para bFGF, PDGF, HGF, IGF, TGF-beta, IL4, IL-10, IL13 o IL-8. Proporcionado en la presente memoria, dicho segundo antígeno es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En una realización, dicho segundo dominio de unión a antígeno puede ser, un anticuerpo (o fragmento del mismo, p. ej., scFv) específico para VEGF; o un receptor para VEGF. En otra realización específica, dicho segundo dominio de unión a antígeno es un receptor para VEGF, en donde dicho receptor para VEGF es VEGFR, p. ej., VEGFR1, VEGFR2 o VEGFR3.

Descrito en la presente memoria, la activación de la transducción de señales proporcionada por dicho segundo antígeno no es antigénica, pero está asociada con hipoxia. En casos más específicos, dicho estímulo es inducido por la activación del factor inducible por hipoxia-1 α (HIF-1 α), HIF-1 β , HIF-2 α , HIF-2 β , HIF-3 α o HIF-3 β .

En otro caso específico, dicho segundo antígeno es una interleucina.

En otro caso específico, dicho segundo antígeno es una molécula de patrón molecular asociada al daño (DAMP; también conocida como alarmina). En un caso más específico, dicha DAMP es una proteína de choque térmico, proteína de alta movilidad del grupo de caja 1 asociada a cromatina (HMGB1), S100A8 (también conocida como MRP8 o calgranulina A), S100A9 (también conocida como MRP14 o calgranulina B), amiloide A de suero (SAA), ácido desoxirribonucleico, trifosfato de adenosina, ácido úrico o sulfato de heparina.

En ciertos casos específicos, dicho segundo antígeno es un antígeno sobre un anticuerpo que se une a un antígeno presentado por una célula tumoral.

En la presente memoria se proporciona un linfocito T modificado (linfocito CAR-T) que comprende un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno y un primer dominio de señalización intracelular, en donde dicho primer polipéptido no comprende un dominio

- coestimulador; y un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a VEGF, y un segundo dominio de señalización intracelular (dominio coestimulador); en donde dicho linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente. En una realización específica, dicho primer antígeno es PSCA, PSMA o BCMA. En otra realización específica, dicho primer dominio de unión a antígeno extracelular comprende un anticuerpo o fragmento del mismo (p. ej., scFv), p. ej., un anticuerpo o fragmento del mismo específico para PSCA, PSMA o BCMA. En otro caso específico, dicho dominio de unión a antígeno que se une a VEGF es un receptor para VEGF, es decir, VEGFR. En otra realización específica, dicho VEGFR es VEGFR1, VEGFR2 o VEGFR3. En otra realización específica, dicho VEGFR es VEGFR2.
- Proporcionado en la presente memoria, dicho segundo polipéptido puede comprender uno o más dominios coestimuladores. En realizaciones específicas, dichos uno o más dominios coestimuladores comprenden uno o más de una secuencia de polipéptido CD27 coestimulador, una secuencia de polipéptido CD28 coestimulador, una secuencia de polipéptido OX40 coestimulador (CD134), una secuencia de polipéptido 4-1BB coestimulador (CD137), TILR2, TILR4, TILR7, TILR9, cadena gamma del receptor de Fc, cadena ϵ del receptor de Fc o una secuencia de polipéptido coestimulador de células T inducible por coestimulador (ICOS).
- En una realización específica de los linfocitos T modificados proporcionados en la presente memoria, dicho primer polipéptido comprende un dominio de unión a antígeno tumoral extracelular y un dominio de señalización CD3 ζ , y en donde dicho segundo polipéptido comprende un dominio de unión a antígeno en donde dicho antígeno es un factor angiogénico o vasculogénico, y uno o más dominios de señalización de moléculas coestimuladoras. Dicho factor angiogénico puede ser, p. ej., VEGF. Dichos uno o más motivos de señalización de moléculas coestimuladoras pueden comprender, p. ej., dominios de señalización coestimuladores de cada uno de CD27, CD28, OX40, ICOS y 4-1BB. En una realización más específica, dicho primer polipéptido comprende un dominio de unión a antígeno tumoral extracelular y un dominio de señalización CD3 ζ , y en donde dicho segundo polipéptido comprende un dominio de unión a antígeno en donde dicho antígeno es VEGF y dominios de señalización coestimuladores de cada uno de CD27, CD28, OX40, ICOS y 4-1BB. En una realización más específica, dicho primer polipéptido o dicho segundo polipéptido comprenden un motivo de supervivencia de células T. En realizaciones más específicas, dicho motivo de supervivencia de células T es, o deriva de, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-7 (IL-7R), un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-12, un dominio de señalización intracelular de IL-15 receptor, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-21, o un dominio de señalización intracelular del receptor del factor de crecimiento transformante β (TGF β). En una realización más específica de dicho linfocito T modificado, por lo tanto, dicho primer polipéptido comprende un dominio de unión a antígeno tumoral extracelular y un dominio de señalización CD3 ζ , y en donde dicho segundo polipéptido comprende un dominio de unión a antígeno en donde dicho antígeno es VEGF, un motivo de supervivencia de células T intracelular de receptor de IL-7 y dominios de señalización coestimuladores de cada uno de CD27, CD28, OX40, ICOS y 4-1BB.
- En otra realización específica del linfocito T modificado, dicho primer antígeno es un antígeno específico de tumor o un antígeno asociado a tumor, y dicho primer dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización CD3 ζ ; y en donde dicho segundo polipéptido comprende un dominio de unión a antígeno que se une a dicho segundo antígeno y dominios de señalización coestimuladores de cada uno de CD27, CD28, OX40, ICOS y 4-1BB. En una realización más específica, dicho segundo polipéptido comprende adicionalmente un motivo de supervivencia de células T intracelular, p. ej., un motivo de supervivencia de células T que es, o deriva de, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-7 (IL-7R), un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-12, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-15, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-21 o un dominio de señalización intracelular del receptor del factor de crecimiento transformante β (TGF β).
- En un caso específico de ciertos linfocitos T descritos en la presente memoria, dicho segundo antígeno es IL-4.
- Se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados en los que solo dicho primer dominio de unión a antígeno o dicho segundo dominio de unión a antígeno se unen a un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor, y el otro de dicho primer dominio de unión a antígeno o dicho segundo dominio de unión a antígeno se unen a un antígeno que no es un antígeno específico de tumor o un antígeno asociado a tumor. Además, en la presente memoria, solo una de la primera o segunda señales estimuladoras es generada por un antígeno específico de tumor o antígeno asociado a tumor; la otra de la primera o segunda señales estimuladoras es generada por otro tipo de antígeno, p. ej., un antígeno (p. ej., proteína u otra biomolécula) asociado con el entorno del tumor).
- También se proporcionan en la presente memoria, en ciertas realizaciones, linfocitos T modificados que comprenden el primer y segundo polipéptidos de la invención, y uno o más polipéptidos adicionales, p. ej., uno o más polipéptidos adicionales que comprenden un dominio de unión a antígeno y un dominio de señalización. En casos específicos, solo uno de dichos polipéptidos (p. ej., solo uno de dicho primer polipéptido, dicho segundo polipéptido o dichos uno o más polipéptidos adicionales) comprende un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor; cada uno de dichos polipéptidos restantes comprende un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno que no es un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor. En otras realizaciones específicas, dos o más de dicho primer polipéptido, dicho segundo polipéptido y dichos uno o

más polipéptidos adicionales comprenden dominios de unión a antígeno que se unen a uno o más antígenos asociados a tumores o antígenos específicos de tumores, en donde al menos uno de dichos polipéptidos comprende un dominio de unión a antígeno que no se une a un antígeno asociado a tumor o a un antígeno específico de tumor.

5 En la presente memoria se proporciona otro linfocito T modificado que comprende un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, y un primer dominio de señalización intracelular; y un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, o un receptor que se une a dicho segundo antígeno; y un segundo dominio de señalización intracelular, en donde dicho segundo polipéptido no comprende un dominio coestimulador; en donde dicho linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico solo cuando dicho primer dominio de
10 señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente. En una realización específica, la unión de dicho primer antígeno a dicho primer dominio de unión al antígeno sin unión de dicho segundo antígeno a dicho segundo dominio de unión, o la unión de dicho segundo antígeno a dicho segundo dominio de unión a antígeno sin unión del primer segundo antígeno a dicho primer dominio de unión induce la anergia de dicho linfocito T modificado, o la falta de respuesta de dicho linfocito T modificado a dicho primer antígeno. En una realización específica, dicho primer dominio de unión a antígeno y dicho segundo dominio de unión a antígeno son independientemente una porción de unión a antígeno de un receptor o una porción de unión a antígeno de un anticuerpo. En otra realización específica, uno o ambos de dicho primer dominio de unión a antígeno o dicho segundo dominio de unión a antígeno son fragmentos de anticuerpo scFv. En realizaciones específicas, dicho primer polipéptido y/o dicho segundo polipéptido comprenden
20 adicionalmente un dominio transmembrana. En una realización más específica, dicho primer polipéptido o dicho segundo polipéptido comprenden un motivo de supervivencia de células T, p. ej., cualquiera de los motivos de supervivencia de células T descritos en la presente memoria.

Proporcionado en la presente memoria, dicho primer antígeno es un antígeno sobre una célula tumoral, p. ej., una célula en un tumor sólido o una célula de cáncer de sangre. Alternativamente, dicho primer antígeno es un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor, p. ej., Her2, antígeno de células madre de próstata (PSCA), PSMA (antígeno de membrana específico de próstata), antígeno de maduración de células B (BCMA), alfafetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de cáncer-125 (CA-125), CA19-9, calretinina, MUC-1, proteína de membrana epitelial (EMA), antígeno de tumor epitelial (ETA), tirosinasa, antígeno asociado a melanoma (MAGE), CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína del fluido de enfermedad quística macroscópica (GCDFP-15), antígeno HMB-45, proteína melan-A (antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T; MART-1), mio-D1, actina específica de músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo 1, la forma dimérica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (M2-PK tumoral), una proteína ras anormal o una proteína p53 anormal. En ciertas realizaciones, el antígeno asociado a tumor es CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRVIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteína, TARP (proteína de marco de lectura alternativa de receptor gamma de células T), Trp-p8 o STEAP1 (antígeno epitelial con seis dominios transmembrana de próstata 1).
35

40 En otra realización específica, dicho primer antígeno es integrina $\alpha\beta3$ (CD61), galactina, K-Ras (oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2) o Ral-B.

Proporcionado en la presente memoria, dicho segundo dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de polipéptido que comprende un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM), p. ej., un dominio de señalización CD3 ζ . En un caso específico, dicho segundo antígeno es un factor de crecimiento, citocina o interleucina. En otro caso específico, dicho segundo antígeno es un factor de crecimiento, citocina o interleucina, asociado con angiogénesis o vasculogénesis, p. ej., bFGF, PDGF, HGF, IGF o IL-8. En otros casos más específicos, la transducción de la señal por dicho segundo receptor quimérico se induce por la activación de un factor asociado a hipoxia, p. ej., HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α , HIF-2 β , HIF-3 α o HIF-3 β . En otros casos específicos, dicho segundo antígeno es una interleucina. En otros casos específicos, dicho segundo antígeno es DAMP, p. ej., una proteína de choque térmico, HMGB1, S100A8, S100A9, SAA, ADN, ATP, ácido úrico o sulfato de heparina. En otros casos específicos, dicho segundo antígeno es un péptido administrado, p. ej., un anticuerpo o un polipéptido sintético. En otros casos específicos, dicho segundo antígeno es un antígeno sobre un anticuerpo que se une a un antígeno presentado por una célula tumoral. En ciertos casos específicos, dicho primer polipéptido y/o dicho segundo polipéptido comprenden uno o más dominios coestimuladores, p. ej., uno o más de una secuencia de polipéptido CD27 coestimulador, una secuencia de polipéptido CD28 coestimulador, una secuencia de polipéptido OX40 coestimulador (CD134), una secuencia de polipéptido 4-1BB coestimulador (CD137), TILR2, TILR4, TILR7, TILR9, cadena gamma del receptor de Fc, cadena ϵ del receptor de Fc o una secuencia de polipéptido coestimulador de células T inducible por coestimulador (ICOS). En cualquiera de las realizaciones anteriores, en una realización específica, dicho primer polipéptido o dicho segundo polipéptido comprenden un motivo de supervivencia de células T, p. ej., dicho motivo de supervivencia de células T es, o deriva de, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-7 (IL-7R), un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-12, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-15, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-21 o un dominio de señalización intracelular del receptor del factor de crecimiento transformante β (TGF β).
55
60

En la presente memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno, en donde la enfermedad o trastorno se caracterizan, o son caracterizables, por un primer antígeno, y están asociados con un segundo antígeno. En un caso, dicho primer antígeno es un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor.

5 3.1 Breve descripción de los dibujos

FIG. 1: Una representación esquemática de cuatro CAR. SP: péptido señal; EC: extracelular; TM: transmembrana; IC: intracelular.

FIG. 2: Una representación esquemática de cuatro CAR. SP: péptido señal; EC: extracelular; TM: transmembrana; IC: intracelular.

10 4. Descripción detallada

Se proporcionan en la presente memoria células del sistema inmunitario modificadas genéticamente, p. ej., linfocitos T (linfocitos T) que se dirigen a células que muestran un antígeno deseado, y que son más específicas para tales células que los agentes terapéuticos basados en linfocitos T existentes. En general, los linfocitos T modificados existentes se modifican para expresar un polipéptido conocido como Receptor de Antígeno Quimérico, o CAR. Véase, p. ej., Eshhar, Patente de Estados Unidos Núm. 7.741.465. Los linfocitos T que expresan CAR se conocen como linfocitos CAR-T. La estructura general de un CAR comprende una única cadena de polipéptido que incluye una porción extracelular y una porción intracelular; se añade opcionalmente una porción transmembrana para anclar el CAR a la membrana celular del linfocito T. La porción extracelular incluye un dominio o motivo que es capaz de unirse a un antígeno de interés, p. ej., un antígeno sobre una célula, por ejemplo, un antígeno específico de tumor o un antígeno asociado a tumor. La porción intracelular incluye un dominio o motivo que puede transmitir una señal de unión a antígeno primaria que es necesaria para la activación de un linfocito T en respuesta a la unión del antígeno a la porción extracelular de CAR. Típicamente, este dominio o motivo comprende, o es, un ITAM (motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina). Los polipéptidos que contienen ITAM adecuados para CAR incluyen, por ejemplo, la cadena CD3 zeta (CD3ζ) o porciones que contienen ITAM de la misma. Dado que los linfocitos T requieren una segunda señal coestimuladora para la activación completa, en iteraciones más recientes del diseño CAR, la porción intracelular comprende adicionalmente uno o más motivos coestimuladores, típicamente una porción coestimuladora de CD27, CD28 o CD137 (4-1BB). Tal diseño permite que un linfocito T que expresa el CAR se active completamente al unirse el antígeno de interés al dominio extracelular del CAR, permitiendo que el linfocito CAR-T destruya la célula que porta el antígeno.

Si bien tales linfocitos T modificados pueden ser altamente eficaces para destruir células no deseables que llevan un antígeno concreto, también son eficaces para destruir células normales que expresan cantidades bajas, pero detectables, de tal antígeno. Tal actividad fuera del tumor de los linfocitos T modificados puede provocar daños graves en los tejidos normales del receptor e incluso la muerte. Por ejemplo, un paciente con cáncer de colon metastásico, al que se han administrado 10^{10} Linfocitos CAR-T dirigidos a tumores que expresan de manera anormalmente alta *ERBB2*, experimentó insuficiencia pulmonar en el plazo de los 15 minutos posteriores a la administración, y posteriormente falleció de fallo multiorgánico y hemorragia. Véase Morgan et al., "Case Report of a Serious Adverse Event Following the Administration of T Lymphocytes Transfected with a Chimeric Antigen Receptor Recognizing *ERBB2*", *Molecular Therapy* 18(4):843-851 (2010). Tales efectos nocivos fuera del tumor limitan severamente la aplicabilidad de los CAR de cadena sencilla y linfocitos T que los expresan.

Sin embargo, tales efectos fuera del tumor mediados por CAR se reducirían o eliminarían separando la transducción de la señal de unión a antígeno primaria de la coestimulación, de modo que la unión al antígeno, por sí sola, no sea suficiente para activar los linfocitos T modificados, p. ej., en donde se esperaría que las señales primarias y secundarias sean únicamente evidentes ambas dentro de los tejidos portadores de tumores, pero no de los normales. Esta separación, como se describe en la presente memoria, se logra mediante el uso de linfocitos T modificados para expresar un polipéptido coestimulador, p. ej., receptor quimérico, o modificado para expresar dos o más polipéptidos artificiales, p. ej., receptores quiméricos, al menos uno de los cuales comprende un dominio de transducción de la señal de unión a antígeno primaria y no comprende un motivo coestimulador, y al menos uno de los cuales comprende un dominio o motivo coestimulador, pero no un dominio de transducción de la señal de unión a antígeno primaria, en donde los dos o más receptores quiméricos no se unen al mismo antígeno. La no unión del polipéptido coestimulador además del polipéptido transductor de señal primaria (ya sea el TCR nativo o un polipéptido artificial) da como resultado una falta de respuesta, anergia o apoptosis de los linfocitos T modificados.

4.1. Linfocitos T modificados biespecíficos

4.1.1. Primera configuración

En la presente memoria se describen linfocitos T modificados que comprenden un único polipéptido coestimulador artificial, p. ej., un receptor quimérico, que proporciona una señal coestimuladora en respuesta a un antígeno concreto; sin embargo, la señal de unión a antígeno primaria se transmite a través de las proteínas receptoras de células T nativas. Este polipéptido único comprende, p. ej., un dominio de unión a antígeno que se une a un primer antígeno, y uno o más dominios coestimuladores, pero carece de un dominio generador de señal de unión a

antígeno primaria, tal como ITAM o CD3 ζ . Las células T modificadas, en esta configuración, dependen del receptor de células T nativo y de la proteína de señalización CD3 ζ para la señalización de unión a antígeno primaria. El polipéptido coestimulador proporciona una señal coestimuladora que mejora la respuesta de los linfocitos T al antígeno concreto. En ciertos casos, la célula T reconoce de forma nativa un primer antígeno, p. ej., un antígeno específico de tumor (TSA) o un antígeno asociado a tumor (TAA), y el polipéptido artificial (p. ej., receptor quimérico) y el dominio de unión a antígeno del polipéptido coestimulador también se une a dicho primer antígeno. En otros casos, la célula T reconoce de forma nativa un primer antígeno, p. ej., un antígeno específico de tumor (TSA) o un antígeno asociado a tumor (TAA), y el polipéptido artificial (p. ej., receptor quimérico), y el dominio de unión a antígeno del polipéptido coestimulador se une a un segundo antígeno diferente, p. ej., un TSA o TAA diferente. En otros casos, la célula T reconoce de forma nativa un primer antígeno, p. ej., un antígeno específico de tumor (TSA) o un antígeno asociado a tumor (TAA), y el polipéptido artificial (p. ej., receptor quimérico), y el dominio de unión a antígeno del polipéptido coestimulador se une a un segundo antígeno que no es un TSA o TAA.

La porción de unión a antígeno del polipéptido artificial (p. ej., receptor quimérico) puede ser cualquier dominio, motivo o secuencia de polipéptido que se una a un antígeno. En ciertos casos, el dominio de unión a antígeno es una porción de unión a antígeno de un receptor o una porción de unión a antígeno de un anticuerpo. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno puede consistir en receptores o una porción de unión a antígeno de los mismos, p. ej., un receptor para un ligando producido por una célula tumoral, un anticuerpo, una cadena de anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, un dominio Fc, un dominio de anclaje de glicofosfatidilinositol o similar. En ciertos casos, por lo tanto, la unión al antígeno es un fragmento de anticuerpo scFv. En ciertos otros casos, el dominio de unión a antígeno es otra forma de agente de unión a antígeno macromolecular basado en péptidos, p. ej., proteína de presentación en fagos. En ciertos otros casos, el dominio de unión al antígeno no se une al antígeno directamente, sino que se une a una proteína modificada que se une al antígeno. En un caso específico, por ejemplo, el dominio de unión a antígeno comprende un ligando, p. ej., biotina, que se une a un ligando, p. ej., avidina, sobre un polipéptido o macromolécula de unión a antígeno. En varios casos, la unión al antígeno por el dominio de unión al antígeno puede restringirse a la presentación del antígeno en asociación con los complejos mayores de histocompatibilidad (MHC), o puede no estar restringido por el MHC.

En ciertos casos, los uno o más dominios coestimuladores dentro del polipéptido artificial (receptor quimérico) comprenden uno o más de una secuencia de polipéptido CD27 coestimulador, una secuencia de polipéptido CD28 coestimulador, una secuencia de polipéptido OX40 coestimulador (CD134), una secuencia de polipéptido 4-1BB coestimulador (CD137), o una secuencia de polipéptido coestimulador de células T inducibles por coestimulador (ICOS).

El primer antígeno puede ser cualquier antígeno de interés, p. ej., un antígeno que se expresa sobre la superficie de una célula. En casos preferidos, dicho primer antígeno es un antígeno sobre una célula tumoral, p. ej., un TAA o TSA. La célula tumoral puede ser una célula, p. ej., de un tumor sólido o un cáncer de sangre. En ciertos casos específicos, dicho antígeno es un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor, p. ej., Her2, antígeno de células madre de próstata (PSCA), PSMA (antígeno de membrana específico de próstata), antígeno de maduración de células B (BCMA), ERK5, alfafetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de cáncer-125 (CA-125), CA19-9, calretinina, MUC-1, proteína de membrana epitelial (EMA), antígeno de tumor epitelial (ETA), tirosinasa, antígeno asociado a melanoma (MAGE), CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína del fluido de la enfermedad quística macroscópica (GCDFP-15), antígeno HMB-45, proteína melan-A (antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T; MART-1), mio-D1, actina específica de músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo 1, la forma dimerica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (M2-PK tumoral), una proteína ras anormal o una proteína p53 anormal. En ciertos casos, el antígeno asociado al tumor es CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRvIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteína, TARP (proteína de marco de lectura alternativo del receptor gamma de células T), Trp-p8 o STEAP1 (antígeno epitelial con seis dominios transmembrana de próstata 1).

En ciertos casos, el TAA o TSA es un antígeno de cáncer/testículo (CT), p. ej., BAGE, CAGE, CTAGE, FATE, GAGE, HCA661, HOM-TES-85, MAGEA, MAGEB, MAGEC, NA88, NY-ESO-1, NY-SAR-35, OY-TES-1, SPANXB1, SPA17, SSX, SYCP1 o TPTE.

En ciertos otros casos, el TAA o TSA es un carbohidrato o gangliósido, p. ej., fuc-GM1, GM2 (antígeno oncofetal-inmunogénico-1; OFA-I-1); GD2 (OFA-I-2), GM3, GD3 y similares.

En ciertos otros casos, el TAA o TSA es alfa-actinina-4, Bage-1, BCR-ABL, proteína de fusión Bcr-Abl, beta-catenina, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, Casp-8, cdc27, cdk4, cdkn2a, CEA, coa-1, proteína de fusión dek-can, EBNA, EF2, antígenos del virus Epstein Barr, proteína de fusión ETV6-AML1, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAA0205, Mart2, Mum-1, 2 y 3, neo-PAP, miosina clase I, OS-9, proteína de fusión pml-RAR α , PTPRK, K-ras, N-ras, trifosfato isomerasa, Gage 3,4,5,6,7, GnTV, Herv-K-mel, Lage-1, NA-88, NY-Eso-1/Lage-2, SP17, SSX-2, TRP2-Int2, gp100 (Pmel 17), tirosinasa, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, RAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15(58), RAGE, SCP-1, Hom/Mel-40, PRAME, p53, H-Ras, HER-2/neu, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, antígenos del virus del papiloma humano (VPH) E6 y E7, TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6,

p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, 13-Catenina, Mum-1, p16, TAGE, PSMA (antígeno de membrana específico de próstata), antígeno de maduración de células B (BCMA), CT7, telomerasa, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, 13HCG, BCA225, BTAA, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB\70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90, TAAL6, TAG72, TLP o TPS.

En otro caso específico, dicho primer antígeno es integrina $\alpha\beta 3$ (CD61), galactina, K-Ras (oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2) o Ral-B.

Los expertos en la técnica conocen otros antígenos asociados a tumores y específicos de tumor y pueden ser diana de los linfocitos T modificados descritos en la presente memoria.

En ciertos casos en los que el segundo antígeno unido al dominio de unión al antígeno del polipéptido artificial no es un TSA o TAA, el antígeno puede ser, p. ej., un factor de crecimiento, citocina o interleucina, p. ej., un factor de crecimiento, citocina o interleucina asociado con angiogénesis o vasculogénesis. Tales factores de crecimiento, citocinas o interleucinas pueden incluir, p. ej., factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) o interleucina-8 (IL-8).

Los tumores también pueden crear un ambiente hipóxico local para el tumor. Como tal, en otros casos más específicos, la transducción de la señal por dicho polipéptido artificial (p. ej., receptor quimérico) es inducida por la activación de un factor asociado a hipoxia, p. ej., HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α , HIF-2 β , HIF-3 α o HIF-3 β , o es inducido de otro modo por la activación del elemento de respuesta hipóxica.

Los tumores también pueden causar daño localizado al tejido normal, causando la liberación de moléculas conocidas como moléculas de patrón molecular asociadas al daño (DAMP, también conocidas como alarminas). En ciertos casos, el segundo antígeno es un DAMP, p. ej., una proteína de choque térmico, proteína de alta movilidad del grupo de caja 1 asociada a cromatina (HMGB1), S100A8 (MRP8, calgranulina A), S100A9 (MRP14, calgranulina B), amiloide A de suero (SAA), ácido desoxirribonucleico, trifosfato de adenosina, ácido úrico o sulfato de heparina.

4.1.2. Segunda configuración, estructura básica

En la presente memoria se proporciona un linfocito T modificado que comprende un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno y un primer dominio de señalización intracelular, en donde dicho primer polipéptido no comprende un dominio coestimulador; y un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, o un receptor que se une a dicho segundo antígeno; y un segundo dominio de señalización intracelular; en donde dicho linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico solo cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente. Típicamente, los dos polipéptidos son ambos receptores quiméricos. La unión de dicho primer antígeno a dicho primer dominio de unión al antígeno sin unión de dicho segundo antígeno a dicho segundo dominio de unión, o la unión de dicho segundo antígeno a dicho segundo dominio de unión a antígeno sin unión del primer segundo antígeno a dicho primer dominio de unión induce anergia de dicho linfocito T modificado, o hace que el linfocito T modificado no responda a la unión del primer antígeno al primer dominio de unión a antígeno solo.

Las porciones de unión a antígeno del primer polipéptido y el segundo polipéptido pueden, independientemente, ser cualquier dominio, motivo o secuencia de polipéptido que se una a un antígeno. Dicho primer dominio de unión a antígeno y dicho segundo dominio de unión a antígeno son independientemente una porción de unión a antígeno de un receptor o una porción de unión a antígeno de un anticuerpo. Por ejemplo, el primer y el segundo dominios de unión a antígeno pueden ser receptores o una porción de unión a antígeno de los mismos, p. ej., un receptor para un ligando producido por una célula tumoral, un anticuerpo, una cadena de anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, un dominio Fc, un dominio de anclaje de glicofosfatidilinositol o similar. En ciertas realizaciones, por lo tanto, uno o ambos de dicho primer dominio de unión a antígeno o dicho segundo dominio de unión a antígeno son fragmentos de anticuerpo scFv. En ciertas otras realizaciones, el primer y segundo dominios de unión a antígeno pueden ser otra forma de agente de unión a antígeno macromolecular basado en péptidos, p. ej., proteínas de presentación en fagos. En diversas realizaciones, la unión al antígeno por parte de los dominios de unión a antígeno puede estar restringida a la presentación del antígeno en asociación con los principales complejos de histocompatibilidad (MHC), o puede no estar restringida por el MHC.

Además de las porciones extracelulares e intracelulares, dicho primer polipéptido y/o dicho segundo polipéptido preferiblemente comprenden adicionalmente un dominio transmembrana. El dominio transmembrana se puede obtener o puede derivar del dominio transmembrana de cualquier proteína transmembrana, y puede incluir todo o una parte de tal dominio transmembrana. En realizaciones específicas, el dominio transmembrana se puede obtener o puede derivar de, p. ej., CD16, un receptor de citocina y un receptor de interleucina, o un receptor del factor de crecimiento, o similares.

El primer polipéptido o dicho segundo polipéptido también pueden comprender un motivo de supervivencia de células T. El motivo de supervivencia de células T puede ser cualquier secuencia o motivo de polipéptido que facilite la supervivencia del linfocito T después de la estimulación por un antígeno. En ciertas realizaciones, el motivo de supervivencia de células T es, o deriva de, CD3, CD28, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-7 (IL-7R), un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-12, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-15, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-21, o un dominio de señalización intracelular del receptor del factor de crecimiento transformante β (TGF β).

El primer dominio de señalización intracelular del primer polipéptido puede ser cualquier polipéptido que sea capaz de transmitir una señal de unión a antígeno desde el primer dominio de unión a antígeno del primer polipéptido, p. ej., de manera similar a las cadenas CD3 ζ (CD3 zeta) del receptor de linfocitos T nativo. Proporcionado en la presente memoria, el primer dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de polipéptido que comprende un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM). Preferiblemente, la secuencia de polipéptido es un dominio de señalización CD3 ζ o una variante de transducción de la señal del mismo.

El segundo polipéptido comprende uno o más dominios coestimuladores, permitiendo que el segundo polipéptido proporcione coestimulación cuando el segundo antígeno se une al segundo dominio de unión a antígeno del segundo polipéptido. Se puede usar cualquier motivo coestimulador, o parte funcional del mismo. En ciertas realizaciones específicas, los uno o más dominios coestimuladores comprenden uno o más de una secuencia de polipéptido CD27 coestimulador, una secuencia de polipéptido CD28 coestimulador, una secuencia de polipéptido OX40 coestimulador (CD134), una secuencia de polipéptido 4-1BBcoestimulador (CD137), o una secuencia de polipéptido coestimulador de células T inducible por coestimulador (ICOS).

El primer antígeno puede ser cualquier antígeno de interés, p. ej., un antígeno que se expresa en la superficie de una célula. Proporcionado en la presente memoria, dicho primer antígeno es un antígeno sobre una célula tumoral, p. ej., un TSA o TAA, p. ej., cualquiera de los TSA o TAA descritos anteriormente. La célula tumoral puede ser una célula, p. ej., de un tumor sólido o un cáncer de sangre.

El antígeno puede ser cualquier antígeno que se exprese en una célula de cualquier tipo de tumor o cáncer, p. ej., células de un linfoma, un cáncer de pulmón, un cáncer de mama, un cáncer de próstata, un carcinoma adrenocortical, un carcinoma de tiroides, un carcinoma nasofaríngeo, un melanoma, p. ej., un melanoma maligno, un carcinoma de piel, un carcinoma colorrectal, un tumor desmoide, un tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, un tumor endocrino, un sarcoma de Ewing, un tumor neuroectodérmico primitivo periférico, un tumor de células germinales sólidas, un hepatoblastoma, un neuroblastoma, un sarcoma de tejidos blandos no rhabdomyosarcoma, un osteosarcoma, un retinoblastoma, un rhabdomyosarcoma, un tumor de Wilms, un glioblastoma, un mixoma, un fibroma, un lipoma o similares. En realizaciones más específicas, dicho linfoma puede ser leucemia linfocítica crónica (linfoma linfocítico pequeño), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmácico, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma esplénico de la zona marginal, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma, linfoma de células B de la zona marginal extranodal, linfoma MALT, linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de células B grandes difuso, linfoma de células B grandes mediastínico (tímico), linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de derrame primario, linfoma de Burkitt, leucemia prolinfocítica de linfocitos T, leucemia linfocítica granular de linfocitos T grandes, leucemia de células NK agresiva, leucemia/linfoma de linfocitos T del adulto, linfoma de linfocitos NK/T extranodal, tipo nasal, linfoma de linfocitos T de tipo enteropatía, linfoma hepatoesplénico de linfocitos T, linfoma de células NK blástico, micosis fungoides, síndrome de Sezary, linfoma de células grandes anaplásico cutáneo primario, papulosis linfomatoide, linfoma de linfocitos T angioinmunoblástico, linfoma de linfocitos T periférico (no especificado), linfoma anaplásico de células grandes, linfoma de Hodgkin o un linfoma no Hodgkin.

El segundo antígeno puede ser cualquier antígeno diferente del primer antígeno, pero preferiblemente está relacionado con el primer antígeno. Por ejemplo, tanto el primer como el segundo antígenos pueden ser antígenos asociados a tumores o antígenos específicos de tumores que están presentes sobre el mismo tipo de célula tumoral. Preferiblemente, el primer antígeno es un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor, y dicho segundo antígeno no es un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor. En tal caso, el segundo antígeno puede estar relacionado con un aspecto del tumor, p. ej., el entorno del tumor. Por ejemplo, un tumor puede inducir un estado inflamatorio en el tejido que lo rodea y puede liberar factores de crecimiento angiogénicos, interleucinas y/o citocinas que promueven la angiogénesis dentro y en la periferia del tumor. Por lo tanto, en algunos casos, el segundo antígeno es un factor de crecimiento, citocina o interleucina, p. ej., un factor de crecimiento, citocina o interleucina asociado con angiogénesis o vasculogénesis. Tales factores de crecimiento, citocinas o interleucinas pueden incluir, p. ej., factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) o interleucina-8 (IL-8). En una realización, el factor de crecimiento es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Los tumores también pueden crear un ambiente hipóxico local para el tumor. Como tal, en otros casos, la transducción de señales por dicho segundo receptor quimérico es inducida por la activación de un factor asociado a hipoxia, p. ej., HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α , HIF-2 β , HIF-3 α o HIF-3 β , o es inducido de otro modo por la activación del elemento de respuesta hipóxico.

Los tumores también pueden causar daño localizado al tejido normal, causando la liberación de moléculas conocidas como moléculas de patrón molecular asociadas al daño (DAMP, también conocidas como alarminas). En ciertos casos, el segundo antígeno es un DAMP, p. ej., una proteína de choque térmico, proteína de alta movilidad del grupo de caja 1 asociada a cromatina (HMGB1), S100A8 (MRP8, calgranulina A), S100A9 (MRP14, calgranulina B), amiloide A de suero (SAA), ácido desoxirribonucleico, trifosfato de adenosina, ácido úrico o sulfato de heparina.

Es posible dirigir un receptor quimérico, p. ej., el segundo polipéptido receptor quimérico, a un antígeno que no es nativo para el antígeno o el tejido circundante. Por ejemplo, las células tumorales, o células del tejido normal circundante, se pueden poner en contacto con un anticuerpo que se une a al menos un antígeno en las células. En este caso, cualquier antígeno en el propio anticuerpo puede unirse a la segunda porción de unión al antígeno del segundo polipéptido receptor quimérico. En ciertos casos, el primer antígeno, que se une a la primera porción de unión a antígeno del primer polipéptido, es un antígeno sobre un anticuerpo que se une a un antígeno presentado por una célula tumoral. En ciertos casos, el segundo antígeno, que se une a la segunda porción de unión a antígeno del segundo polipéptido, es un antígeno sobre un anticuerpo que se une a un antígeno presentado por una célula tumoral. En ciertos casos, el primer antígeno es un antígeno sobre un primer anticuerpo, y el segundo antígeno es un antígeno sobre un segundo anticuerpo. En tal caso, el primer anticuerpo puede ser un anticuerpo que se une a, p. ej., un antígeno asociado a un tumor o un antígeno específico de tumor, y el segundo anticuerpo es un anticuerpo para una citocina, interleucina, factor de crecimiento, DAMP u otra proteína no TAA, no TSA asociada con el tumor.

4.1.3. Configuraciones específicas

Se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno y un dominio de señalización CD3 ζ intracelular; y b) un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un factor angiogénico o vasculogénico, y un segundo dominio de señalización intracelular, en donde dicho primer polipéptido no comprende un dominio coestimulador; en donde dicho linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico solo cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

En otra configuración, se describen en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un scFv o una porción de unión a antígeno del mismo que se une a un primer antígeno, y un dominio de señalización CD3 ζ intracelular, en donde dicho primer polipéptido no comprende un dominio coestimulador; y b) un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un factor angiogénico o vasculogénico, y un segundo dominio de señalización intracelular; en donde dicho linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico solo cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

En una realización específica, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, en donde dicho primer antígeno es un antígeno asociado a tumor (TAA) o antígeno específico de tumor (TSA), y un dominio de señalización CD3 ζ intracelular, en donde dicho primer polipéptido no comprende un dominio coestimulador; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, en donde dicho segundo antígeno es VEGF, y un segundo dominio de señalización intracelular; en donde dicho linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico solo cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente. En algunos casos, dicho segundo antígeno es bFGF, PDGF, HGF, IGF o IL-8.

En otra realización específica, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, en donde dicho primer antígeno es un TAA o TSA, y un primer dominio de señalización CD3 ζ intracelular, en donde dicho primer polipéptido no comprende un dominio coestimulador; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, en donde dicho segundo antígeno es VEGF, y un segundo dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización coestimulador de uno o más de CD27, CD28, OX40, ICOS, y 4-1BB; en donde dicho linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico solo cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente. En algunos casos, dicho segundo antígeno es bFGF, PDGF, HGF, IGF o IL-8.

En otra realización específica, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, en donde dicho primer antígeno es Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, calretinina, MUC-1, EMA, ETA, tirosinasa, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, GFAP, GCDFP-15, antígeno HMB-45, MART-1, mio-D1, MSA, neurofilamento, NSE, fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo 1, M2-PK tumoral, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRvIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteína, TARP (proteína de marco de lectura alternativo del receptor

gamma de células T), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial con seis dominios transmembrana de próstata 1) , una proteína ras anormal o una proteína p53 anormal; y un dominio de señalización CD3 ζ intracelular, en donde dicho primer polipéptido no comprende un dominio coestimulador; y b) un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, en donde dicho segundo antígeno es VEGF, y un segundo dominio de señalización intracelular que comprende dominios de señalización coestimuladores de uno o más de CD27, CD28, OX40, ICOS y 4-1BB; en donde dicho linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico solo cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente. En algunos casos, dicho segundo antígeno es bFGF, PDGF, HGF, IGF o IL-8.

En otra realización más específica, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, en donde dicho primer antígeno es Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, calretinina, MUC-1, EMA, ETA, tirosinasa, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, GFAP, GCDFP-15, antígeno HMB-45, MART-1, mio-D1, MSA, neurofilamento, NSE, fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo 1, M2-PK tumoral, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRvIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteína, TARP (proteína de marco de lectura alternativo del receptor gamma de células T), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial con seis dominios transmembrana de próstata 1), una proteína ras anormal, o una proteína p53 anormal, y un dominio de señalización CD3 ζ intracelular, en donde dicho primer el polipéptido no comprende un dominio coestimulador; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, en donde dicho segundo antígeno es VEGF, y un dominio de señalización intracelular que comprende dominios de señalización coestimuladores de cada uno de CD27, CD28, OX40, ICOS, y 4-1BB; en donde dicho linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico solo cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente. En algunos casos, dicho segundo antígeno es bFGF, DGF, HGF, IGF o IL-8.

En otra realización más específica, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un scFv o una porción de unión a antígeno del mismo que se une a un primer antígeno, en donde dicho primer antígeno es Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, calretinina, MUC-1, EMA, ETA, tirosinasa, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, GFAP, GCDFP-15, antígeno HMB-45, MART-1, mio-D1, MSA, neurofilamento, NSE, fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo 1, M2-PK tumoral, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRvIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteína, TARP (proteína de marco de lectura alternativo del receptor gamma de células T), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial con seis dominios transmembrana del próstata 1), una proteína ras anormal, o una proteína p53 anormal, y un dominio de señalización CD3 ζ intracelular, en donde dicho primer polipéptido no comprende un dominio coestimulador; y b) un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, en donde dicho segundo antígeno es VEGF, y un segundo dominio de señalización intracelular que comprende dominios de señalización coestimuladores de cada uno de CD27, CD28, OX40, ICOS, y 4-1BB; en donde dicho linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico solo cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente. En algunos casos, dicho segundo antígeno es bFGF, PDGF, HGF, IGF o IL-8.

En cualquiera de las realizaciones específicas anteriores, uno o ambos de dicho primer polipéptido o dicho segundo polipéptido comprenden un motivo de supervivencia de células T, p. ej., un motivo de supervivencia de células T de CD28, IL-7R, IL-12R, IL-15R, IL-21R, TGF β R.

4.1.4. Tercera configuración, estructura básica

Los dos polipéptidos (p. ej., receptores quiméricos) comprendidos dentro de los linfocitos T modificados se pueden construir de modo que la unión del primer antígeno, p. ej., Un TAA o TSA, al primer dominio de unión al antígeno del primer polipéptido no produzca una señal de unión a antígeno primaria, sino una señal coestimuladora, y la unión de un segundo antígeno produce la señal de unión al antígeno primaria. Tal configuración gozaría de las mismas ventajas que la primera configuración, más arriba, ya que los dos eventos de unión al antígeno deben tener lugar para activar completamente el linfocito T.

Por lo tanto, en la presente memoria se proporciona un linfocito T modificado que comprende: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno y un primer dominio de señalización intracelular; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno; y un segundo dominio de señalización intracelular, en donde dicho segundo polipéptido no comprende un dominio coestimulador; en donde dicho linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico solo cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente. Como anteriormente, el primer antígeno y el segundo antígeno son antígenos diferentes. En una realización específica, la

unión de dicho primer antígeno a dicho primer dominio de unión al antígeno sin unión de dicho segundo antígeno a dicho segundo dominio de unión, o la unión de dicho segundo antígeno a dicho segundo dominio de unión a antígeno sin unión del primer segundo antígeno a dicho primer dominio de unión induce la anergia de dicho linfocito T modificado.

5 En ciertas realizaciones, dicho primer dominio de unión a antígeno y dicho segundo dominio de unión a antígeno son independientemente cualquier dominio de unión a antígeno, p. ej., cualquiera de los dominios de unión a antígeno descritos anteriormente, p. ej., una porción de unión a antígeno de un receptor o una porción de unión a antígeno de un anticuerpo. En una realización más específica, uno o ambos de dichos primer dominio de unión a antígeno o dicho segundo dominio de unión a antígeno son fragmentos de anticuerpo scFv.

10 El primer polipéptido comprende uno o más dominios coestimuladores, permitiendo que el primer polipéptido proporcione coestimulación cuando el primer antígeno se une al primer dominio de unión a antígeno del primer polipéptido. Se puede utilizar cualquier motivo coestimulador, o porción funcional del mismo. En ciertas realizaciones específicas, los uno o más dominios coestimuladores comprenden uno o más de una secuencia de polipéptido CD27 coestimulador, una secuencia de polipéptido CD28 coestimulador, una secuencia de polipéptido OX40 coestimulador (CD134), una secuencia de polipéptido 4-1BB coestimulador (CD137), o una secuencia de polipéptido coestimulador de células T inducible por coestimulador (ICOS).

15 El segundo dominio de señalización intracelular del segundo polipéptido puede ser cualquier polipéptido que sea capaz de transmitir una señal de unión a antígeno desde el segundo dominio de unión a antígeno del segundo polipéptido, p. ej., de manera similar a las cadenas CD3 ζ (CD3 zeta) del receptor de linfocitos T nativo. En ciertas realizaciones, el segundo dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de polipéptido que comprende un motivo de activación del inmuno-receptor basado en tirosina (ITAM). Preferiblemente, la secuencia de polipéptido es un dominio de señalización CD3 ζ o una variante de transducción de la señal del mismo.

20 En ciertas realizaciones, dicho primer polipéptido o dicho segundo polipéptido comprenden adicionalmente un dominio transmembrana. En ciertas realizaciones, el primer polipéptido comprende uno o más dominios coestimuladores, permitiendo que el primer polipéptido proporcione coestimulación cuando el primer antígeno se une al primer dominio de unión a antígeno del segundo polipéptido. Se puede utilizar cualquier dominio coestimulador, o porción funcional del mismo, p. ej., dominios de señalización coestimuladores de cada uno de CD27, CD28, OX40, ICOS y 4-1BB. En ciertas otras realizaciones, dicho primer polipéptido o dicho segundo polipéptido comprenden un motivo de supervivencia de células T.

25 En esta configuración, el primer antígeno puede ser cualquier antígeno de interés, p. ej., un antígeno que se expresa sobre la superficie de una célula. Dicho primer antígeno puede ser un antígeno sobre una célula tumoral. La célula tumoral puede ser una célula, p. ej., de un tumor sólido o un cáncer de sangre, p. ej., cualquiera de los tipos de cáncer o tumor descritos anteriormente. Dicho antígeno también puede ser un TAA o TSA, p. ej., cualquiera de los TAA o TSA descritos anteriormente.

30 El segundo antígeno puede ser cualquier antígeno diferente del primer antígeno, pero preferiblemente está relacionado con el primer antígeno. Por ejemplo, tanto el primer como el segundo antígenos pueden ser antígenos asociados a tumores o antígenos específicos de tumores que están presentes en el mismo tipo de células tumorales. Preferiblemente, el primer antígeno es un TAA o TSA, y dicho segundo antígeno no es un TAA o TSA. En tal caso, el segundo antígeno puede estar relacionado con un aspecto del tumor, p. ej., el entorno del tumor. Por ejemplo, un tumor puede inducir un estado inflamatorio en el tejido que lo rodea y puede liberar factores de crecimiento angiogénicos, interleucinas y/o citocinas que promueven la angiogénesis dentro y en la periferia del tumor. Por lo tanto, en casos específicos, el segundo antígeno es un factor de crecimiento, citocina o interleucina, p. ej., un factor de crecimiento, citocina o interleucina asociado con angiogénesis o vasculogénesis, p. ej., bFGF, PDGF, HGF, IGF o IL-8. Proporcionado en la presente memoria, el segundo antígeno es VEGF. En casos específicos, la transducción de señales por dicho segundo receptor quimérico se induce por la activación de un factor asociado a hipoxia, p. ej., HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α , HIF-2 β , HIF-3 α o HIF-3 β . En ciertos otros casos, el segundo antígeno es un DAMP, p. ej., una proteína de choque térmico, HMGB1, S100A8 (MRP8, calgranulina A), S100A9 (MRP14, calgranulina B), SAA, ácido desoxirribonucleico, trifosfato de adenosina, ácido úrico o sulfato de heparina.

4.1.5. Configuraciones específicas

35 Por lo tanto, en una configuración, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno y un primer dominio de señalización intracelular; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un factor angiogénico o vasculogénico, y un dominio de señalización CD3 ζ intracelular, en donde dicho segundo polipéptido no comprende un dominio coestimulador; en donde dicho linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico solo cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

En otra configuración, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un

primer polipéptido que comprende un scFv o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a un primer antígeno y un primer dominio de señalización intracelular; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un factor angiogénico o vasculogénico, y un dominio de señalización CD3 ζ intracelular, en donde dicho segundo polipéptido no comprende un dominio coestimulador; en donde dicho linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico solo cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

En una configuración más específica, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, en donde dicho primer antígeno es un antígeno asociado a tumor (TAA) o antígeno específico de tumor (TSA), y un primer dominio de señalización intracelular; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, en donde dicho segundo antígeno es VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF o IL-8, y un dominio de señalización CD3 ζ intracelular, en donde dicho segundo polipéptido no comprende un dominio coestimulador; en donde dicho linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico solo cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

Se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, en donde dicho primer antígeno es un TAA o TSA, y un primer dominio de señalización intracelular que comprende dominios de señalización coestimuladores de uno o más de CD27, CD28, OX40, ICOS y 4-1BB; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, en donde dicho segundo antígeno es VEGF, y un dominio de señalización CD3 ζ intracelular, en donde dicho segundo polipéptido no comprende un dominio coestimulador; en donde dicho linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico solo cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente. En algunos casos, dicho segundo antígeno es bFGF, PDGF, HGF, IGF o IL-8.

En otra realización más específica, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, en donde dicho primer antígeno es Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, calretinina, MUC-1, EMA, ETA, tirosinasa, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, GFAP, GCDFP-15, antígeno HMB-45, MART-1, mio-D1, MSA, neurofilamento, NSE, fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo 1, M2-PK tumoral, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRvIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteína, TARP (proteína de marco de lectura alternativo del receptor gamma de células T), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial con seis dominios transmembrana de próstata 1), una proteína ras anormal o una proteína p53 anormal; y un dominio de señalización intracelular que comprende dominios de señalización coestimuladores de uno o más de CD27, CD28, OX40, ICOS y 4-1BB; y b) un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, en donde dicho segundo antígeno es VEGF, y un dominio de señalización CD3 ζ intracelular, en donde dicho segundo polipéptido no comprende un dominio coestimulador; en donde dicho linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico solo cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente. En algunos casos, dicho segundo antígeno es bFGF, PDGF, HGF, IGF o IL-8.

En otra realización más específica, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, en donde dicho primer antígeno es Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, calretinina, MUC-1, EMA, ETA, tirosinasa, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, GFAP, GCDFP-15, antígeno HMB-45, MART-1, mio-D1, MSA, neurofilamento, NSE, fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo 1, M2-PK tumoral, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRvIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteína, TARP (proteína de marco de lectura alternativo del receptor gamma de células T), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial con seis dominios transmembrana de próstata 1), una proteína ras anormal, o una proteína p53 anormal, y un dominio de señalización intracelular que comprende dominios de señalización coestimuladores de cada uno de CD27, CD28, OX40, ICOS y 4-1BB; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, en donde dicho segundo antígeno es VEGF, y un dominio de señalización CD3 ζ intracelular, en donde dicho segundo polipéptido no comprende un dominio coestimulador; en donde dicho linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico solo cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente. En algunos casos, dicho segundo antígeno es bFGF, PDGF, HGF, IGF o IL-8.

En otra realización más específica, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden un primer polipéptido que comprende: a) un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une

a un primer antígeno, en donde dicho primer dominio de unión a antígeno extracelular es un scFv o porción de unión a antígeno del mismo, y en donde dicho primer antígeno es Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, calretinina, MUC-1, EMA, ETA, tirosinasa, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, GFAP, GCDFP-15, antígeno HMB-45, MART-1, mio-D1, MSA, neurofilamento, NSE, fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo 1, M2-PK tumoral, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRvIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), proteína espermatocítica 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteína, TARP (proteína del marco de lectura alternativo del receptor gamma de células T), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial con seis dominios transmembrana de próstata 1), una proteína ras anormal, o una proteína p53 anormal; y un dominio de señalización intracelular que comprende dominios de señalización coestimuladores de cada uno de CD27, CD28, OX40, ICOS y 4-1BB; y b) un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, en donde dicho segundo antígeno es VEGF, y un dominio de señalización CD3 ζ intracelular, en donde dicho primer polipéptido no comprende un dominio coestimulador; en donde dicho linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico solo cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente. En algunos casos, dicho segundo antígeno es bFGF, PDGF, HGF, IGF o IL-8.

En cualquiera de las configuraciones específicas anteriores, uno o ambos de dicho primer polipéptido o dicho segundo polipéptido comprenden un motivo de supervivencia de células T, p. ej., un motivo de supervivencia de células T de CD28, IL-7R, IL-12R, IL-15R, IL-21R, TGF β R.

4.1.6. Cuarta configuración, estructura básica

En una cuarta configuración, los dos receptores quiméricos contenidos dentro de los linfocitos T modificados se pueden construir de modo que un primer receptor quimérico dirigido a un primer antígeno comprenda dominios de señalización de unión a antígeno primarios y dominios coestimuladores, pero ninguna secuencia de polipéptido que comprenda un motivo de supervivencia de células T, mientras que un segundo receptor quimérico, dirigido a un segundo antígeno, comprende una secuencia de polipéptido que comprende un motivo de supervivencia de células T. En esta configuración, los linfocitos T se dirigen a las células que expresan un antígeno deseado y, tras la unión al antígeno, se generan señales de unión al antígeno y coestimuladoras; sin embargo, en ausencia de la unión del segundo receptor quimérico a un segundo antígeno, los linfocitos T no están dirigidos a sobrevivir. Como tales, los efectos fuera del tumor son, nuevamente, eliminados o mitigados.

Por lo tanto, en la presente memoria se proporciona un linfocito T modificado que comprende: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, un dominio de señalización y uno o más motivos coestimuladores; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, y un motivo de supervivencia de células T, en donde dicho segundo polipéptido no comprende un motivo coestimulador; en donde dicho linfocito modificado sobrevive solo cuando dicho dominio de señalización y dicho motivo de supervivencia de células T son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente. En ciertos casos, dicho motivo de supervivencia de células T es un motivo de supervivencia de células T intracelular del receptor de IL-7, es un motivo de supervivencia de células T de CD28, IL-7R, IL-12R, IL-15R, IL-21R o TGF β R. En ciertos casos, uno o ambos de dicho primer polipéptido o dicho segundo polipéptido comprenden un dominio transmembrana. En un caso más específico, dicho segundo polipéptido comprende un dominio de CD27, CD28, IL-7R, IL-12R, IL-15R, IL-21R o TGF β R que comprende un motivo de supervivencia de células T.

Como anteriormente, estructuralmente el primer dominio de unión a antígeno y dicho segundo dominio de unión a antígeno son independientemente cualquier dominio de unión a antígeno, p. ej., cualquiera de los dominios de unión a antígeno descritos anteriormente, p. ej., una porción de unión a antígeno de un receptor o una porción de unión a antígeno de un anticuerpo. En una realización más específica, uno o ambos de dicho primer dominio de unión a antígeno o dicho segundo dominio de unión a antígeno son fragmentos de anticuerpo scFv. El primer antígeno puede ser cualquier antígeno de interés, p. ej., un antígeno que se expresa sobre la superficie de una célula. Dicho primer antígeno puede ser un antígeno sobre una célula tumoral. La célula tumoral puede ser una célula, p. ej., de un tumor sólido o un cáncer de sangre, p. ej., cualquiera de los tipos de cáncer o tumor descritos anteriormente. Dicho antígeno también puede ser un TAA o TSA, p. ej., cualquiera de los TAA o TSA descritos anteriormente. En ciertos casos, el segundo antígeno, que es diferente del primer antígeno, puede ser un factor angiogénico o vasculogénico, p. ej., cualquiera de los factores angiogénicos o vasculogénicos descritos anteriormente; o cualquier DAMP, p. ej., los DAMP descritos anteriormente. En otros casos específicos, la transducción de la señal por dicho segundo receptor quimérico se induce por la activación de un factor asociado a hipoxia, p. ej., HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α , HIP-2 β , HIF-3 α o HIP-3 β .

El primer dominio de señalización intracelular del primer polipéptido puede ser cualquier polipéptido que sea capaz de transmitir una señal de unión a antígeno desde el primer dominio de unión a antígeno del primer polipéptido, p. ej., de manera similar a las cadenas CD3 ζ (CD3 zeta) del receptor de linfocitos T nativo. El segundo dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de polipéptido que comprende un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM). Preferiblemente, la secuencia de polipéptido es un dominio de señalización CD3 ζ o una variante de transducción de la señal del mismo. El primer polipéptido comprende

adicionalmente uno o más dominios coestimuladores, p. ej., cualquier motivo coestimulador o porción funcional del mismo, p. ej., una secuencia de polipéptido coestimulador CD27, CD28, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137) o ICOS.

4.1.7. Configuraciones específicas

5 En una configuración, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, un dominio de señalización CD3 ζ intracelular y uno o más motivos coestimuladores; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, y un motivo de supervivencia de células T, en donde dicho segundo polipéptido no comprende un motivo coestimulador; en donde dicho linfocito modificado sobrevive solo cuando dicho dominio de señalización y dicho motivo de supervivencia de células T son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

15 En otra configuración, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, un dominio de señalización CD3 ζ intracelular y una secuencia de polipéptido coestimulador de CD27, CD28, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137) o ICOS; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, y un motivo de supervivencia de células T, en donde dicho segundo polipéptido no comprende un motivo coestimulador; en donde dicho linfocito modificado sobrevive solo cuando dicho dominio de señalización y dicho motivo de supervivencia de células T son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

20 En otra configuración, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, un dominio de señalización CD3 ζ intracelular y una secuencia de polipéptido coestimulador de CD27, CD28, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137) o ICOS; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, en donde dicho segundo antígeno es un factor angiogénico o vasculogénico, o un DAMP, y un motivo de supervivencia de células T, en donde dicho segundo polipéptido no comprende un motivo coestimulador; en donde dicho linfocito modificado sobrevive solo cuando dicho dominio de señalización y dicho motivo de supervivencia de células T son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente. En otras realizaciones más específicas, la transducción de la señal por dicho segundo receptor quimérico es inducida por la activación de un factor asociado a hipoxia, p. ej., HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α , HIF-2 β , HIF-3 α o HIF-3 β .

35 En otra configuración, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, un dominio de señalización CD3 ζ intracelular y una secuencia de polipéptido coestimulador de CD27, CD28, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137) o ICOS; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, en donde dicho segundo antígeno es VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF o IL-8, y un motivo de supervivencia de células T, en donde dicho segundo polipéptido no comprende un motivo coestimulador; en donde dicho linfocito modificado sobrevive solo cuando dicho dominio de señalización y dicho motivo de supervivencia de células T son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

40 En otra configuración, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, un dominio de señalización CD3 ζ intracelular y una secuencia de polipéptido coestimulador de CD28, OX40 y 4-1BB; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, y un motivo de supervivencia de células T, en donde dicho segundo polipéptido no comprende un motivo coestimulador; en donde dicho linfocito modificado sobrevive solo cuando dicho dominio de señalización y dicho motivo de supervivencia de células T son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

50 En otra configuración, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, en donde dicho primer antígeno es un TAA o TSA, un dominio de señalización CD3 ζ intracelular y una secuencia de polipéptido coestimulador de CD27, CD28, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137) o ICOS; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, y un motivo de supervivencia de células T, en donde dicho segundo polipéptido no comprende un motivo coestimulador; en donde dicho linfocito modificado sobrevive solo cuando dicho dominio de señalización y dicho motivo de supervivencia de células T son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

55 En otra configuración, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, en donde dicho primer antígeno es un TAA o TSA, un dominio de señalización CD3 ζ intracelular y una

secuencia de polipéptido coestimulador de CD27, CD28, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137) o ICOS; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, en donde dicho segundo antígeno es VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF o IL-8, y un motivo de supervivencia de células T, en donde dicho segundo polipéptido no comprende un motivo coestimulador; en donde dicho linfocito modificado sobrevive solo cuando dicho dominio de señalización y dicho motivo de supervivencia de células T son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

En otra configuración, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, en donde dicho primer antígeno es Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, calretinina, MUC-1, EMA, ETA, tirosinasa, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, GFAP, GCDFP-15, antígeno HMB-45, MART-1, mio-D1, MSA, neurofilamento, NSE, fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo 1, M2-PK tumoral, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRvIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteína, TARP (proteína de marco de lectura alternativo del receptor gamma de células T), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial con seis dominios transmembrana de próstata 1), una proteína ras anormal o una proteína p53 anormal; un dominio de señalización CD3 ζ intracelular; y una secuencia de polipéptido coestimulador de CD27, CD28, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137) o ICOS; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, y un motivo de supervivencia de células T, en donde dicho segundo polipéptido no comprende un motivo coestimulador; en donde dicho linfocito modificado sobrevive solo cuando dicho dominio de señalización y dicho motivo de supervivencia de células T son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

En otra configuración, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, en donde dicho primer antígeno es Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, calretinina, MUC-1, EMA, ETA, tirosinasa, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, GFAP, GCDFP-15, antígeno HMB-45, MART-1, mio-D1, MSA, neurofilamento, NSE, fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo 1, M2-PK tumoral, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRvIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteína, TARP (proteína de marco de lectura alternativo del receptor gamma de células T), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial con seis dominios transmembrana de próstata 1), una proteína ras anormal o una proteína p53 anormal; un dominio de señalización CD3 ζ intracelular; y una secuencia de polipéptido coestimulador de cada uno de CD27, CD28, OX40 y 4-1BB; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, en donde dicho segundo antígeno es VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF o IL-8, y un motivo de supervivencia de células T, en donde dicho segundo polipéptido no comprende un motivo coestimulador; en donde dicho linfocito modificado sobrevive solo cuando dicho dominio de señalización y dicho motivo de supervivencia de células T son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

En otra configuración, en la presente memoria se proporcionan linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, calretinina, MUC-1, EMA, ETA, tirosinasa, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, GFAP, GCDFP-15, antígeno HMB-45, MART-1, myo-D1, MSA, neurofilamento, NSE, fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo 1, M2-PK tumoral, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRvIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteína, TARP (proteína de marco de lectura alternativo del receptor gamma de células T), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial con seis dominios transmembrana de próstata 1), una proteína ras anormal o una proteína p53 anormal; un dominio de señalización CD3 ζ intracelular; y una secuencia de polipéptido coestimulador de cada uno de CD27, CD28, OX40 y 4-1BB; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a VEGF, en donde dicho segundo polipéptido no comprende un motivo coestimulador; en donde dicho linfocito modificado sobrevive solo cuando dicho dominio de señalización y dicho motivo de supervivencia de células T son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

4.1.8. Quinta configuración, estructura básica

En una quinta configuración, los dos receptores quiméricos contenidos dentro de los linfocitos T modificados se pueden construir de modo que un primer receptor quimérico dirigido a un primer antígeno comprenda un primer dominio de unión a antígeno extracelular y un motivo de supervivencia de células T, p. ej., un motivo de supervivencia de células T intracelular, pero sin dominio de señalización de unión a antígeno primaria (p. ej., CD3 ζ), y sin dominios coestimuladores, mientras que un segundo receptor quimérico, dirigido a un segundo antígeno, comprende una secuencia de polipéptido que comprende un dominio de señalización de unión a antígeno primaria (p. ej., CD3 ζ), y uno o más dominios coestimuladores. En esta configuración, los linfocitos T se dirigen a las células que expresan un antígeno deseado y, al unirse al antígeno, se genera una señal de supervivencia de linfocitos T; sin

embargo, en ausencia de la unión del segundo receptor quimérico a un segundo antígeno, debido a que no se generan señales de unión al antígeno y coestimuladoras, los linfocitos T no se activan. Como tales, los efectos fuera del tumor son, nuevamente, eliminados o mitigados.

5 Por lo tanto, se describe en la presente memoria un linfocito T modificado que comprende: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, y un motivo de supervivencia de células T, en donde dicho primer polipéptido no comprende un dominio de señalización de unión a antígeno primaria o un motivo coestimulador; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, y uno o más motivos coestimuladores; en donde dicho linfocito modificado sobrevive y se activa solo cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente. En ciertos casos, dicho motivo de supervivencia de células T es un motivo de supervivencia de células T intracelular del receptor de IL-7, es un motivo de supervivencia de células T de CD28, IL-7R, IL-12R, IL-15R, IL-21R o TGFβR. En ciertos casos, uno o ambos de dicho primer polipéptido o dicho segundo polipéptido comprenden un dominio transmembrana. En un caso más específico, dicho primer polipéptido comprende un dominio de CD27, CD28, IL-7R, IL-12R, IL-15R, IL-21R o TGFβR que comprende un motivo de supervivencia de células T.

20 Como anteriormente, estructuralmente el primer dominio de unión a antígeno y dicho segundo dominio de unión a antígeno son independientemente cualquier dominio de unión a antígeno, p. ej., cualquiera de los tipos de dominios de unión a antígeno descritos anteriormente, p. ej., una porción de unión a antígeno de un receptor o una porción de unión a antígeno de un anticuerpo. En un caso más específico, uno o ambos de dicho primer dominio de unión a antígeno o dicho segundo dominio de unión a antígeno son fragmentos de anticuerpo scFv. El primer antígeno puede ser cualquier antígeno de interés, p. ej., un antígeno que se expresa sobre la superficie de una célula. En casos preferidos, dicho primer antígeno es un antígeno sobre una célula tumoral. La célula tumoral puede ser una célula, p. ej., de un tumor sólido o un cáncer de sangre, p. ej., cualquiera de los tipos de cáncer o tumor descritos anteriormente. En ciertos casos específicos, dicho antígeno es un TAA o TSA, p. ej., cualquiera de los TAA o TSA descritos anteriormente. El segundo antígeno, que es diferente del primer antígeno, puede ser un factor angiogénico o vasculogénico, p. ej., cualquiera de los factores angiogénicos o vasculogénicos descritos anteriormente; o cualquier DAMP, p. ej., los DAMP descritos anteriormente. En un caso específico, la transducción de la señal por dicho segundo receptor quimérico es inducida por la activación de un factor asociado a hipoxia, p. ej., HIF-1α, HIF-1β, HIF-2α, HIF-2β, HIF-3α o HIF-3β.

30 El dominio de señalización intracelular del segundo polipéptido puede ser cualquier polipéptido que sea capaz de transmitir una señal de unión al antígeno desde el dominio de unión al antígeno del segundo polipéptido, p. ej., de manera similar a las cadenas CD3ζ (CD3 zeta) del receptor de linfocitos T nativo. En ciertos casos, el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de polipéptido que comprende un motivo de activación del inmunoceptor basado en tirosina (ITAM). Preferiblemente, la secuencia de polipéptido es un dominio de señalización CD3ζ o una variante de transducción de la señal del mismo. El segundo polipéptido comprende adicionalmente uno o más dominios coestimuladores, p. ej., cualquier motivo coestimulador o porción funcional del mismo, p. ej., una secuencia de polipéptido coestimulador de CD27, CD28, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137) o ICOS.

4.1.9. Configuraciones específicas

40 En una configuración, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, y un motivo de supervivencia de células T, en donde dicho primer polipéptido no comprende un dominio de señalización de unión a antígeno primaria y no comprende un motivo coestimulador; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, un dominio de señalización CD3ζ intracelular y uno o más motivos coestimuladores; en donde dicho linfocito modificado se activa y sobrevive solo cuando dicho dominio de señalización y dicho motivo de supervivencia de células T son activados por dicho segundo antígeno y dicho primer antígeno, respectivamente.

50 En otra configuración, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, y un motivo de supervivencia de células T, en donde dicho primer polipéptido no comprende un dominio de señalización de unión a antígeno primaria y no comprende un motivo coestimulador; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, un dominio de señalización CD3ζ intracelular y una secuencia de polipéptido coestimulador de CD27, CD28, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137), o ICOS; en donde dicho linfocito modificado se activa y sobrevive solo cuando dicho motivo de supervivencia de células T y dicho dominio de señalización son activados por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

60 En otra configuración, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, y un motivo de supervivencia de células T, en donde dicho primer polipéptido no comprende un dominio de señalización de unión a antígeno primaria y no comprende un motivo coestimulador; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, en donde

dicho segundo antígeno es un factor angiogénico o vasculogénico, o un DAMP, un dominio de señalización CD3 ζ intracelular y una secuencia de polipéptido coestimulador de CD27, CD28, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137) o ICOS; en donde dicho segundo polipéptido no comprende un dominio de señalización de unión a antígeno primaria y no comprende un motivo coestimulador; en donde dicho linfocito modificado sobrevive solo cuando dicho motivo de supervivencia de células T y dicho dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

En otra configuración, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, y un motivo de supervivencia de células T, en donde dicho primer polipéptido no comprende un dominio de señalización de unión a antígeno primaria y no comprende un motivo coestimulador; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, en donde dicho segundo antígeno es VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF o IL-8, un dominio de señalización CD3 ζ intracelular y una secuencia de polipéptido coestimulador de CD27, CD28, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137) o ICOS; en donde dicho linfocito modificado sobrevive solo cuando dicho motivo de supervivencia de células T y dicho dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

En otra configuración, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, y un motivo de supervivencia de células T, en donde dicho primer polipéptido no comprende un dominio de señalización de unión a antígeno primaria y no comprende un motivo coestimulador; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, un dominio de señalización CD3 ζ intracelular y una secuencia de polipéptido coestimulador de CD28, OX40 y 4-1BB; en donde dicho linfocito modificado sobrevive solo cuando dicho motivo de supervivencia de células T y dicho dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

En otra configuración, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, en donde dicho primer antígeno es un TAA o TSA, y un motivo de supervivencia de células T, en donde dicho primer polipéptido no comprende un dominio de señalización de unión a antígeno primaria y no comprende un motivo coestimulador; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, un dominio de señalización CD3 ζ intracelular y una secuencia de polipéptido coestimulador de CD27, CD28, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137), o ICOS; en donde dicho linfocito modificado sobrevive solo cuando dicho motivo de supervivencia de células T y dicho dominio de señalización son ambos activados por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

En otra configuración, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, en donde dicho primer antígeno es un TAA o TSA, y un motivo de supervivencia de células T, en donde dicho primer el polipéptido no comprende un dominio de señalización de unión a antígeno primaria y no comprende un motivo coestimulador; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF o IL-8, un dominio de señalización CD3 ζ intracelular y una secuencia de polipéptido coestimulador de CD27, CD28, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137) o ICOS; en donde dicho linfocito modificado sobrevive solo cuando dicho motivo de supervivencia de células T y dicho dominio de señalización son ambos activados por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

En otra configuración, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, en donde dicho primer antígeno es Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, calretinina, MUC-1, EMA, ETA, tirosinasa, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, GFAP, GCDFP-15, antígeno HMB-45, MART-1, mio-D1, MSA, neurofilamento, NSE, fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo 1, M2-PK tumoral, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRvIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteína, TARP (proteína de marco de lectura alternativo del receptor gamma de células T), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial con seis dominios transmembrana de próstata 1) , una proteína ras anormal o una proteína p53 anormal; y un motivo de supervivencia de células T, en donde dicho primer polipéptido no comprende un dominio de señalización de unión a antígeno primaria y no comprende un motivo coestimulador; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, un dominio de señalización CD3 ζ intracelular; y una secuencia de polipéptido coestimulador de CD27, CD28, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137) o ICOS; en donde dicho linfocito modificado sobrevive solo cuando dicho motivo de supervivencia de células T y dicho dominio de señalización son ambos activados por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

En otra configuración, se proporcionan en la presente memoria linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, en donde dicho primer antígeno es Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, calretinina, MUC-1, EMA, ETA, tirosinasa, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina,

desmina, GFAP, GCDFP-15, antígeno HMB-45, MART-1, mio-D1, MSA, neurofilamento, NSE, fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo 1, M2-PK tumoral, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRvIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteína, TARP (proteína de marco de lectura alternativo del receptor gamma de células T), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial con seis dominios transmembrana de próstata 1), una proteína ras anormal o una proteína p53 anormal; y un motivo de supervivencia de células T, en donde dicho primer polipéptido no comprende un dominio de señalización de unión a antígeno primaria y no comprende un motivo coestimulador; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, en donde dicho segundo antígeno es VEGF, bFGF, PDGF, HGF, IGF o IL-8; un dominio de señalización CD3 ζ intracelular; y una secuencia de polipéptido coestimulador de cada uno de CD27, CD28, OX40 y 4-1BB; en donde dicho linfocito modificado sobrevive solo cuando dicho motivo de supervivencia de células T y dicho dominio de señalización son ambos activados por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

En otra configuración, en la presente memoria se proporcionan linfocitos T modificados que comprenden: a) un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a Her2, PSCA, PSMA, BCMA, ERK5, AFP, CEA, CA-125, CA19-9, calretinina, MUC-1, EMA, ETA, tirosinasa, MAGE, CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, GFAP, GCDFP-15, antígeno HMB-45, MART-1, myo-D1, MSA, neurofilamento, NSE, fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo 1, M2-PK tumoral, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRvIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteína, TARP (proteína de marco de lectura alternativo del receptor gamma de células T), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial con seis dominios transmembrana de próstata 1), una proteína ras anormal o un anormal proteína p53; y un motivo de supervivencia de células T, en donde dicho primer polipéptido no comprende un dominio de señalización de unión a antígeno primaria y no comprende un motivo coestimulador; y b) un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, en donde dicho segundo antígeno es VEGF; un dominio de señalización CD3 ζ intracelular; y una secuencia de polipéptido coestimulador de cada uno de CD27, CD28, OX40 y 4-1BB; en donde dicho linfocito modificado sobrevive solo cuando dicho motivo de supervivencia de células T y dicho dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

4.1.10. Otras configuraciones

En ciertas realizaciones, el linfocito T modificado comprende un TCR modificado como primer polipéptido y un segundo polipéptido artificial que produce una señal coestimuladora. En realizaciones específicas, el TCR modificado se modifica, p. ej., mediante el reemplazo del dominio de unión al antígeno nativo por un dominio que se une a un antígeno específico. En un caso específico, los linfocitos T se transforman con polinucleótidos que codifican las cadenas alfa y beta del TCR anti-MART-1. Los linfocitos T pueden transformarse de manera similar con polinucleótidos que codifican subunidades de TCR alfa y beta, donde el TCR se dirige a un antígeno, p. ej., un TSA o TAA. En realizaciones preferidas, el linfocito T modificado se transforma adicionalmente con un polinucleótido que codifica un polipéptido coestimulador artificial, p. ej., el polipéptido coestimulador descrito anteriormente, o uno de los segundos polipéptidos descritos anteriormente.

En ciertos casos en los que los linfocitos T modificados comprenden dos polipéptidos, p. ej., receptores quiméricos, un primer polipéptido comprende un primer dominio de unión a antígeno, un dominio de transducción de la señal de unión a antígeno primaria (p. ej., CD3 ζ) y un único dominio coestimulador (p. ej., CD28 o una secuencia de polipéptido coestimulador del mismo), y un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno y al menos un dominio coestimulador, p. ej., un dominio coestimulador de CD27, 4-1BB, OX40, IL-7R o similar. En un caso más específico, el segundo polipéptido comprende al menos dos, o al menos tres dominios coestimuladores.

En ciertas realizaciones, los linfocitos T modificados proporcionados en la presente memoria comprenden un primer polipéptido (p. ej., receptor quimérico) que comprende un primer dominio de unión a antígeno, un dominio de transducción de la señal de unión a antígeno primaria (p. ej., CD3 ζ) y ningún dominio coestimulador (p. ej., CD28 o una secuencia de polipéptido coestimulador del mismo); un segundo polipéptido (receptor quimérico) que comprende un segundo dominio de unión a antígeno y al menos un dominio coestimulador; y un tercer polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno y al menos otro dominio coestimulador. En esta realización, el número total de dominios coestimuladores se divide entre al menos dos receptores quiméricos separados. Los al menos dos receptores quiméricos diferentes pueden comprender dominios de unión a antígeno que se unen al mismo antígeno, o antígenos diferentes.

4.2. Polipéptidos aislados (receptores de antígenos quiméricos)

El primer y segundo polipéptidos proporcionados en la presente memoria, útiles para producir los linfocitos T modificados proporcionados en la presente memoria, pueden modificarse mediante, p. ej., acilación, amidación, glicosilación, metilación, fosforilación, sulfatación, sumoilación, ubiquitinación o similares. Los polipéptidos se pueden marcar con una marca capaz de proporcionar una señal detectable, p. ej., con radioisótopos y compuestos

fluorescentes. Una o más cadenas laterales del primer o segundo polipéptidos se pueden derivatizar, p. ej., derivatización de residuos lisinilo y amino terminales con anhídridos de ácido succínico u otros ácidos carboxílicos, o derivatización con, p. ej., imidoésteres tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobenzenosulfónico; O-metilourea; 2,4-pentanodiona; y reacción con glioxilato catalizada por transaminasas. Los grupos laterales carboxilo, aspártico o glutámico, se pueden modificar selectivamente por reacción con carbodiimidias (R-N = C = N-R') tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida.

4.3. Ácidos nucleicos aislados

Los polipéptidos descritos (p. ej., receptores quiméricos) pueden ser codificados por secuencias de polinucleótidos de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Los polinucleótidos pueden estar contenidos dentro de cualquier vector polinucleotídico adecuado para la transformación de células inmunitarias, p. ej., linfocitos T. Por ejemplo, los linfocitos T se pueden transformar utilizando vectores sintéticos, vectores lentivirales o retrovirales, plásmidos autónomamente replicantes, virus (p. ej., un retrovirus, lentivirus, adenovirus o virus del herpes), o similares, que contienen polinucleótidos que codifican el primer y segundo polipéptidos (p. ej., receptores quiméricos). Los vectores lentivirales adecuados para la transformación de linfocitos T incluyen, pero no se limitan a, p. ej., los vectores lentivirales descritos en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.994.136; 6.165.782; 6.428.953; 7.083.981; y 7.250.299. Los vectores de VIH adecuados para la transformación de linfocitos T incluyen, pero no se limitan a, p. ej., los vectores lentivirales descritos en Patente de Estados Unidos Núm. 5.665.577.

Los ácidos nucleicos útiles en la producción del primer y segundo polipéptidos, p. ej., dentro de un linfocito T modificado, incluyen ADN, ARN o análogos de ácido nucleico. Los análogos de ácido nucleico se pueden modificar en el radical de la base, el radical del azúcar o la cadena principal de fosfato, y pueden incluir la sustitución de desoxiuridina por desoxitimidina, la sustitución de 5-metil-2'-desoxicitidina o 5-bromo-2'-desoxicitidina por desoxicitidina. Las modificaciones del radical de azúcar pueden incluir la modificación del hidroxilo 2' del azúcar ribosa para formar azúcares 2'-O-metilo o 2'-O-alilo. La cadena principal de fosfato de desoxirribosa se puede modificar para producir ácidos morfolinonucleicos, en los que cada radical de base está unido a un anillo de morfolino o ácidos peptidonucleicos de seis miembros, en los que la cadena principal de desoxifosfato se reemplaza por una cadena principal de pseudopéptido y las cuatro bases se conservan. Véanse, p. ej., Summerton y Weller (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7:187-195; y Hyrup et al., (1996) *Bioorgan. Med. Chain.* 4:5-23. Además, la cadena principal de desoxifosfato se puede reemplazar, p. ej., por una cadena principal de fosforotioato o fosforoditioato, una fosfoamida o una cadena principal de alquilfosfotriéster.

4.4. Linfocitos T

Los linfocitos T utilizados en las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria pueden ser linfocitos T no sometidos a tratamiento previo o linfocitos T restringidos para MHC. En ciertas realizaciones, los linfocitos T son linfocitos infiltrantes de tumores (TIL). En ciertas realizaciones, los linfocitos T se han aislado de una biopsia tumoral, o se han expandido a partir de linfocitos T aislados de una biopsia tumoral. En ciertas otras realizaciones, las células T se han aislado o se han expandido a partir de linfocitos T expandidos a partir de sangre periférica, sangre del cordón umbilical o linfa.

Las células inmunitarias, p. ej., linfocitos T modificados, utilizadas en los presentes métodos son preferiblemente autólogas para un individuo al que se van a administrar los linfocitos T modificados. En ciertas otras realizaciones, los linfocitos T modificados son alogénicos para un individuo al que se van a administrar los linfocitos T modificados. Cuando se utilizan linfocitos T alogénicos para preparar linfocitos T modificados, es preferible seleccionar linfocitos T que reduzcan la posibilidad de enfermedad de injerto contra anfitrión (EICH) en el individuo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los linfocitos T específicos de virus se seleccionan para la preparación de linfocitos T modificados; se espera que tales linfocitos tengan una capacidad nativa muy reducida para unirse a, y por lo tanto ser activados por, cualquier antígeno receptor. En ciertas realizaciones, el rechazo mediado por el receptor de los linfocitos T alogénicos se puede reducir mediante la administración conjunta al anfitrión de uno o más agentes inmunosupresores, p. ej., ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, ciclofosfamida o similares.

En una realización, los linfocitos T se obtienen de un individuo, opcionalmente se expanden a continuación, y después se transforman con un primer polinucleótido que codifica el primer polipéptido y un segundo polinucleótido que codifica el segundo polipéptido, y opcionalmente se expanden a continuación. Los transformantes dobles se pueden seleccionar utilizando, p. ej., un marcador seleccionable único para cada uno de los vectores. En otra realización, los linfocitos T se obtienen de un individuo, opcionalmente se expanden a continuación, y después se transforman con un polinucleótido que codifica el primer polipéptido y el segundo polipéptido, y opcionalmente se expanden a continuación. Las células que contienen el polinucleótido se seleccionan utilizando un marcador seleccionable.

En ciertas realizaciones, los linfocitos T modificados comprenden proteínas TCR nativas, p. ej., TCR- α y TCR- β que son capaces de formar complejos TCR nativos, además del polipéptido coestimulador artificial (en realizaciones en las que se utiliza un solo polipéptido coestimulador), o además del primer polipéptido y el segundo polipéptido (en realizaciones en las que los linfocitos T modificados comprenden polipéptidos que separan la señalización de unión

al antígeno y la señalización coestimuladora). En ciertas otras realizaciones, uno o ambos genes nativos que codifican TCR- α y TCR- β en los linfocitos T modificados se modifican para que no sean funcionales, p. ej., una porción o todos se eliminan, se inserta una mutación, etc.

5 En ciertas realizaciones, los linfocitos T se aíslan de una lesión tumoral, p. ej., son linfocitos infiltrantes de tumores; se espera que tales linfocitos T sean específicos para un TSA o TAA.

10 En ciertas realizaciones, los motivos de señalización del primer polipéptido y el segundo polipéptido se pueden utilizar para promover la proliferación y expansión de los linfocitos T modificados. Por ejemplo, los linfocitos T no modificados y los linfocitos T que comprenden un polipéptido que comprende un dominio de señalización CD3 ζ y un dominio coestimulador CD28 se pueden expandir utilizando anticuerpos contra CD3 y CD28, p. ej., anticuerpos anclados a esferas; véanse, p. ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.948.893; 6.534.055; 6.352.694; 6.692.964; 6.887.466; y 6.905.681. De forma similar, los anticuerpos para un motivo de señalización sobre el primer polipéptido y los anticuerpos para un motivo de señalización sobre el segundo polipéptido se pueden utilizar para estimular la proliferación de linfocitos T que comprenden tanto el primer como el segundo polipéptidos.

15 En ciertas realizaciones, si el primer y el segundo polipéptidos se expresan con el linfocito T a partir de un solo vector o dos vectores separados, el primer y el segundo antígenos a los que se unen el primer polipéptido y el segundo polipéptido, respectivamente, se pueden utilizar para promover la expansión selectiva de los linfocitos T que expresan tanto el primer polipéptido como el segundo polipéptido. Por ejemplo, en un caso, en el que el primer antígeno, al que se une el primer polipéptido, es un TSA, y el segundo antígeno, al que se une el segundo polipéptido, es un factor angiogénico, los linfocitos T que comprenden el primer polipéptido y el segundo polipéptido se cultivan en presencia del TSA y el factor angiogénico, lo que da como resultado un aumento de la proliferación en comparación con el cultivo en presencia del primer o segundo antígenos, solos o en ausencia de cualquiera de ellos.

20 En ciertas otras realizaciones, los linfocitos T que comprenden el primer y segundo polipéptidos son estimulados para que proliferen utilizando un anticuerpo que se une a un dominio de señalización sobre el primer polipéptido acoplado con un antígeno que se puede unir al segundo polipéptido. Por ejemplo, en realizaciones en las que el dominio de señalización del primer polipéptido es CD3 ζ y el antígeno que se une al segundo polipéptido es VEGF, los linfocitos T que comprenden el primer y segundo polipéptidos se estimulan para proliferar cultivando las células en presencia de VEGF en combinación con un anticuerpo que se une a CD3 ζ . En otras realizaciones, los linfocitos T que comprenden el primer y segundo polipéptidos son estimulados para que proliferen utilizando un antígeno que se puede unir al primer polipéptido y un motivo coestimulador sobre el segundo péptido. Por ejemplo, en realizaciones en las que el antígeno que se une al primer polipéptido es HER2 y el motivo coestimulador sobre el segundo polipéptido se obtiene a partir de CD28, los linfocitos T que comprenden el primer y segundo polipéptidos son estimulados para que proliferen mediante el cultivo de las células en la presencia de proteína HER2 y un anticuerpo que se une a CD28.

25 En cualquiera de las realizaciones anteriores, el antígeno y/o anticuerpo pueden existir libres en el medio en el que los linfocitos T son cultivos, o uno o ambos se pueden anclar a un soporte sólido, p. ej., superficie plástica de cultivo de tejido, esferas o similares.

30 Los linfocitos T modificados pueden comprender opcionalmente un "gen suicida" o "interruptor de seguridad" que permite la eliminación de sustancialmente todos los linfocitos T modificados cuando se desee. Por ejemplo, los linfocitos T modificados, en ciertas realizaciones, pueden comprender un gen de timidina quinasa de HSV (HSV-TK), que causa la muerte de los linfocitos T modificados al entrar en contacto con ganciclovir. En otra realización, los linfocitos T modificados comprenden una caspasa inducible, p. ej., una caspasa 9 inducible (caspasa9), p. ej., una proteína de fusión entre la caspasa 9 y la proteína de unión a FK506 humana que permite la dimerización utilizando una molécula farmacéutica pequeña específica. Véase Straathof et al., Blood 105(11):4247-4254 (2005).

4.5. Métodos de uso de linfocitos T modificados

35 Las células inmunitarias modificadas, p. ej., los linfocitos T modificados proporcionados en la presente memoria, se pueden utilizar para tratar a un individuo que tiene uno o más tipos de células que desea que sean elegidas como diana por los linfocitos T, p. ej., para destruirlas. En ciertos casos, las células que se van a destruir son células cancerosas, p. ej., células tumorales. En casos preferidos, las células cancerosas son células de un tumor sólido. En casos específicos, las células son células de un linfoma, un cáncer de pulmón, un cáncer de mama, un cáncer de próstata, un carcinoma adrenocortical, un carcinoma de tiroides, un carcinoma nasofaríngeo, un melanoma, p. ej., un melanoma maligno, un carcinoma de piel, un carcinoma colorrectal, un tumor desmoide, un tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, un tumor endocrino, un sarcoma de Ewing, un tumor neuroectodérmico primitivo periférico, un tumor sólido de células germinales, un hepatoblastoma, un neuroblastoma, un sarcoma de tejido blando no rhabdomyosarcoma, un osteosarcoma, un retinoblastoma, un rhabdomyosarcoma, un tumor de Wilms, un glioblastoma, un mixoma, un fibroma, un lipoma o similares. En casos más específicos, dicho linfoma puede ser leucemia linfocítica crónica (linfoma linfocítico pequeño), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma esplénico de la zona marginal, mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, linfoma de células B de la zona marginal extranodal, linfoma MALT, linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de células grandes B difuso,

5 linfoma de células B grandes mediastínico (tímico), linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de derrame primario, linfoma de Burkitt, leucemia prolinfocítica de linfocitos T, leucemia linfocítica granular de linfocitos T grandes, leucemia de células NK agresiva, leucemia/linfoma de linfocitos T del adulto, linfoma de linfocitos NK/T extranodal, tipo nasal, linfoma de linfocitos T de tipo enteropatía, linfoma hepatoesplénico de linfocitos T, linfoma de células NK blástico, micosis fungoides, síndrome de Sezary, linfoma anaplásico cutáneo primario de células grandes, papulosis linfomatoide, linfoma de linfocitos T angioinmunoblástico, linfoma de linfocitos T periférico (no especificado), linfoma anaplásico de células grandes, linfoma de Hodgkin o un linfoma no Hodgkin.

10 La eficacia de los linfocitos T modificados, después de la administración a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno remediable por linfocitos T, p. ej., un individuo que tiene cáncer, se puede evaluar mediante uno o más criterios, específicos para la enfermedad o trastorno particular, conocidos por los expertos con un conocimiento práctico normal de la técnica, que son indicativos del progreso de la enfermedad o trastorno. Generalmente, la administración de los linfocitos T modificados a tal individuo es eficaz cuando uno o más de dichos criterios se mueven de manera detectable, p. ej., de manera significativa, desde un valor o intervalo de estado de enfermedad a, o hacia, un valor o intervalo normal.

15 Los linfocitos T modificados se pueden formular en cualquier solución farmacéuticamente aceptable, preferiblemente una solución adecuada para el suministro de células vivas, p. ej., solución salina (tal como solución de Ringer), gelatinas, carbohidratos (p. ej., lactosa, amilosa, almidón o similares), ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidina, etc. Tales preparaciones se esterilizan preferiblemente antes de la adición de los linfocitos T modificados, y se pueden mezclar con agentes auxiliares tales como lubricantes, conservantes, estabilizadores, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones y colorantes. Los portadores farmacéuticos adecuados para su uso en la formulación de linfocitos T modificados son conocidos en la técnica y se describen, p. 20 ej., en el documento WO 96/05309.

25 En ciertas realizaciones, los linfocitos T modificados se formulan en dosis individuales, en donde dichas dosis individuales comprenden al menos, como máximo, o aproximadamente 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} o 1×10^{11} linfocitos T modificados. En ciertas realizaciones, los linfocitos T modificados se formulan para administración intravenosa, intraarterial, parenteral, intramuscular, subcutánea, intratecal o intraocular, o administración dentro de un órgano o tejido concretos.

5. Ejemplos

5.1. Ejemplo de referencia 1: Tratamiento del cáncer de próstata

30 Se presenta un individuo con cáncer de próstata en estadio T2, sin diseminación a los ganglios linfáticos regionales u otros (N0, M0). Se determina que el grado histológico es G2. En general, se determina que el individuo tiene cáncer de próstata en Estadio II. Al individuo se le administran entre 10^9 y 10^{10} linfocitos T modificados que comprenden un solo receptor quimérico, en 200 mL de solución salina por infusión intravenosa durante 30 minutos. El receptor quimérico comprende una región de unión a antígeno extracelular que se une a PSCA, un dominio transmembrana y dominios coestimuladores intracelulares de cada uno de CD27, CD28, 4-1BB y OX40. Se vuelve a 35 evaluar al individuo para determinar el estadio del cáncer de próstata y la diseminación a los ganglios linfáticos, y se realiza la histología del tejido prostático sometido a biopsia, a los 30, 60 y 90 días de la administración.

5.2. Ejemplo de referencia 2: Tratamiento del cáncer de próstata

40 Se presenta un individuo con cáncer de próstata en estadio T2, sin diseminación a los ganglios linfáticos regionales u otros (N0, M0). Se determina que el grado histológico es G2. En general, se determina que el individuo tiene cáncer de próstata en Estadio II. Al individuo se le administran entre 10^9 y 10^{10} linfocitos T modificados que comprenden un primer y segundo receptor quimérico, en 200 mL de solución salina por infusión intravenosa durante 30 minutos. El primer receptor quimérico comprende una región de unión a antígeno extracelular que se une a PSCA, un dominio transmembrana y un dominio de transducción de señales derivado de CD3 ζ . El segundo receptor 45 quimérico comprende un dominio de unión a antígeno que se une a la proteína ERK5, un dominio transmembrana y dominios coestimuladores intracelulares de cada uno de CD27, CD28, 4-1BB y OX40. Se vuelve a evaluar al individuo para determinar el estadio del cáncer de próstata y la diseminación a los ganglios linfáticos, y se realiza la histología del tejido prostático sometido a biopsia, a los 30, 60 y 90 días de la administración.

5.3. Ejemplo de referencia 3: Tratamiento del cáncer de mama

50 Se presenta un individuo con cáncer de mama en estadio 3 que se ha diseminado a al menos un ganglio linfático regional. Después de la cirugía para extirpar el tejido canceroso, se administra al individuo entre 10^9 y 10^{10} linfocitos T modificados que comprenden un primer y segundo receptores quimérico, en 200 mL de solución salina por infusión intravenosa durante 30 minutos. El primer receptor quimérico comprende una región de unión a antígeno extracelular que se une a HER2, un dominio transmembrana y un dominio de transducción de señales derivado de CD3 ζ . El 55 segundo receptor quimérico comprende un dominio de unión a antígeno que se une al receptor de estrógenos (ER), un dominio transmembrana y dominios coestimuladores intracelulares de cada uno de CD27, CD28, 4-1BB y OX40. Se evalúa el cáncer de mama en el tejido mamario restante y la diseminación a otros ganglios linfáticos, 30, 60, 90 y 180 días después de la administración.

5.4. Ejemplo 4: Linfocitos T modificados que tienen especificidad de antígeno doble

Este ejemplo describe la generación de linfocitos T modificados que comprenden dos receptores de antígeno quimérico (CAR), en donde el primer CAR comprende un dominio de unión a antígeno específico para un antígeno específico de tumor y en donde el segundo CAR comprende un dominio de unión a antígeno específico para un antígeno que es no es un antígeno específico de tumor, pero que está asociado con la tumorigénesis.

Construcciones de CAR

Los CAR representados en la Figura 1 se prepararon utilizando metodología convencional. Se construyó un CAR basado en anti-HER2, "HER2-CAR ζ ", que consistía en un scFv de un anticuerpo anti-HER2 conectado a una bisagra de CD28, un dominio transmembrana (TM) de CD28, una cadena zeta de CD3 y un gen indicador tdTomato y se clonó en un vector de lentivirus. Este CAR representa un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno específico para un antígeno específico de tumor y un dominio estimulador.

Se generaron dos CAR, "VEGFR2-CD28" y "VEGFR2-28TM-CD28", que comprendían un dominio de unión a antígeno específico para VEGF, un antígeno que no es un antígeno específico de tumor y un dominio coestimulador. Ambos CAR comprenden un dominio de unión a antígeno formado por una porción de un receptor para el antígeno VEGF, a saber, VEGFR2. VEGFR2-CD28 comprende el dominio extracelular (EC) de VEGFR2 humano seguido de un dominio TM de VEGFR2, un dominio IC de CD28, una secuencia T2A (el péptido 2A del virus Thosea asigna) y GFP (para su uso como gen indicador). VEGFR2-28TM-CD28 comprende el dominio extracelular (EC) de VEGFR2 humano seguido de un dominio TM de CD28, un dominio intracelular (IC) de CD28, una secuencia T2A y GFP.

También se generó una construcción de control para el reconocimiento de VEGF. La construcción de control, designada "VEGFR2", comprende el dominio extracelular (EC) de VEGFR2 humano seguido de un dominio TM de VEGFR2, una secuencia T2A y GFP. La construcción de control por lo tanto carece del dominio IC de CD28 presente en las construcciones designadas VEGFR2-CD28 y VEGFR2-28TM-CD28.

Expresión de construcciones de CAR en células T

Se examinó la expresión de las construcciones de CAR descritas anteriormente por las células T. Para aislar las células T, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se separaron de las capas leucocíticas derivadas de sangre completa de donantes sanos utilizando centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque Plus™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Las células Pan T se seleccionaron negativamente a partir de PBMC utilizando el Pan T Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Cambridge, MA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los plásmidos que comprendían las construcciones de CAR HER2-CAR ζ , VEGFR2-CD28, VEGFR2-28TM-CD28 o VEGFR2 se sometieron a electroporación en células T primarias, y las células T sometidas a electroporación se cultivaron en medio RPMI-10 durante la noche. Las células T se recogieron a las 24 horas de la electroporación y se tiñeron con proteína quimera de HER2-Fc de IgG humana, seguido de tinción con un anticuerpo policlonal anti-Fc de IgG humana de cabra conjugado con APC (para la detección anti-HER2); o un anticuerpo monoclonal anti-VEGFR2 humano de ratón (mAb; para la detección de VEGFR2). Las células teñidas se analizaron mediante citometría de flujo. En todos los casos, se detectó la expresión del dominio de unión a antígeno de los CAR y los genes informadores de cada CAR (tdTomato o GFP), confirmando la transducción estable de las células T por los transgenes. La transducción de células T activadas con IL-7 con cada construcción de CAR confirmó adicionalmente que la construcción HER2-CAR ζ puede mediar la expresión anti-HER2 en células T transfectadas y que las construcciones de CAR VEGFR2-CD28, VEGFR2-28TM-CD28 y VEGFR2 pueden mediar la expresión positiva de VEGFR2 en células T transfectadas.

Producción de VEGF y expresión de VEGFR2 por células T activadas

Para asegurarse de que la expresión endógena de VEGFR2 no compita con la expresión del dominio extracelular de VEGFR2 en las construcciones que contienen el dominio EC de VEGFR2 para unirse al VEGF, se llevaron a cabo experimentos preliminares para evaluar los niveles de producción de VEGFR2 y de expresión de VEGFR2 por células T activadas.

Las células T primarias humanas se aislaron como se describió anteriormente y se estimularon con DynaBeads® anti-CD3/CD28 en una proporción de 3 a 1 esferas por célula. Las células se cultivaron en medio RPMI-10 en presencia de IL-2 a 50 UI/mL. La expresión de VEGFR2 por las células T estimuladas se evaluó mediante citometría de flujo durante 25 días después de la estimulación (todos los días durante los primeros 4 días, después cada dos días después de la primera semana). La expresión de VEGFR2 por las células T activadas no se observó hasta el día 2 después de la estimulación, seguido de una disminución drástica en la expresión en torno al día 3 y la desaparición de la expresión en torno al día 4. Después del día 4, no se observó la expresión de VEGFR2.

El VEGF-A en el sobrenadante de células T después de la activación de DynaBead descrita anteriormente se midió mediante Cytometric Bead Array (CBA). Se detectó una secreción mínima de VEGF (<10 pg/mL).

Los datos sugieren que las células T humanas activadas expresan mínimamente VEGF y VEGFR2 endógenos.

Ensayo de coestimulación

Para evaluar la capacidad de las construcciones que comprenden el dominio EC de VEGFR2 para mediar la coestimulación, las células pan T primarias humanas se transfectaron con los lentivectores VEGFR2-CD28, VEGFR2-28TM-CD28 o VEGFR2 seguido de estimulación con mAb anti-CD3 humano y anti-VEGFR2 humanos inmovilizados o VEGF soluble. El anti-CD3 humano se seleccionó como ligando para desencadenar la primera "señal" en el sistema de señalización doble (es decir, la unión de un antígeno tumoral mediante un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno específico a un antígeno tumoral y un dominio de activación (p. ej., una cadena zeta de CD3)). El cultivo de las células T con mAb anti-VEGFR2 o VEGF soluble dio como resultado la estimulación de las células T que habían sido transfectadas con el lentivector VEGFR2-CD28 o el lentivector VEGFR2-28TM-CD28, pero no con células T transfectadas con el lentivector VEGFR2, como lo demuestra la regulación por incremento de los marcadores de activación CD69 y 4-1BB.

Además, se determinó que las células T transfectadas con el lentivector VEGFR2-CD28 y con el lentivector VEGFR2-28TM-CD28, pero no las células T transfectadas con lentivector VEGFR2, secretan niveles elevados de IL-2, granzima B e IFN- γ tras el tratamiento con mAb anti-VEGFR2 o el tratamiento con VEGF. Tomados en conjunto, los resultados indican que la expresión del dominio EC de VEGFR2 en células T transfectadas puede mediar la señalización intracelular de CD28 cuando EC de VEGFR2 es expresado como parte de un CAR que comprende un dominio IC de CD28.

Evaluación funcional de HER2-CAR ζ

La validación funcional de HER2-CAR ζ se determinó en células T transfectadas por estimulación de las células T con proteína quimera HER2-Fc inmovilizada. Como control positivo para la coestimulación de CD28, se generó otra construcción, "HER2-CAR28 ζ ", que es idéntica a la construcción de CAR denominada HER2-CAR ζ con la excepción de la inclusión de un dominio intracelular CD28 entre el dominio transmembrana (TM) de CD28 y la cadena zeta de CD3.

Para determinar la estimulación de las células T por la proteína quimera HER2-Fc, se examinó la expresión de los marcadores de activación de células T CD69 y CD71 48 horas después de la estimulación. Solo las células positivas para tdTomato mostraron una regulación positiva de CD69 y CD71 tanto en las células transfectadas con HER2-CAR ζ como con HER2-CAR28 ζ . Se observó una mayor frecuencia e intensidad de fluorescencia media de CD69 y CD71 en las células T transfectadas con HER2-CAR28 ζ en comparación con las células T transfectadas con HER2-CAR ζ (42% de las células HER2-CAR28 ζ expresaron CD69 en comparación con 25% de expresión por las células HER2-CAR ζ (células transfectadas simuladas = expresión de 0,04%); 27% de las células HER2-CAR28 ζ expresaron CD71 en comparación con 10% de expresión por las células HER2-CAR ζ (células transfectadas simuladas = expresión de 0,04%)), indicando la actividad del dominio de señalización intracelular de CD28 de la construcción HER2-CAR28 ζ .

También se determinó el efecto del cultivo con mAb anti-VEGFR2 o VEGF con células T transfectadas con HER2-CAR ζ o HER2-CAR28 ζ . Las células T se trataron con mAb contra HER2-Fc y VEGFR2 o VEGF durante 48 horas, seguido de un análisis de citometría de flujo para evaluar la expresión superficial de CD69 y CD71. Solo se observó una mejora muy mínima de la expresión de CD69 y CD71 con respecto a la descrita anteriormente.

Evaluación del sistema de señalización doble

Después de que se confirmó la coestimulación mediada por VEGFR2, se evaluó la señalización doble de HER2-CAR ζ y VEGFR2-CD28IC. Para evaluar la señalización doble, las células T se aislaron como se describió anteriormente y se transfectaron tanto con (i) un CAR que comprende un dominio anti-HER2 (es decir, HER2-CAR ζ); como con (ii) un CAR que comprende un dominio extracelular del receptor VEGFR2 (es decir, el CAR designado VEGFR2-CD28, VEGFR2-28TM-CD28 o VEGFR2). La expresión de cada CAR por las células T transfectadas se confirmó utilizando citometría de flujo mediante la medición de la expresión del gen indicador (es decir, tdTomato o GFP), como se describió anteriormente.

La expresión de los marcadores de activación de células T CD69 y CD71 por las células T transfectadas con HER2-CAR ζ y una de las tres construcciones de CAR VEGFR2 (es decir, la construcción de CAR denominada VEGFR2-CD28, VEGFR2-28TM-CD28 o VEGFR2) se examinó después de la estimulación de las células T con HER2-Fc y mAb anti-VEGFR2 o VEGF.

A continuación, se observó un aumento sensible a la dosis de la expresión de CD69 y CD71 en células T que expresaban GFP (es decir, células T que expresaban una construcción de CAR que comprendía un dominio EC de VEGFR2). La estimulación con VEGF también mostró la amplificación de la expresión de CD69 y CD71 en células T que expresaban GFP (es decir, células T que expresaban una construcción de CAR que comprendía un dominio EC de VEGFR2). A las dosis más altas sometidas a prueba (1 μ g/mL de HER2-Fc/1 μ g/mL de anti-VEGFR2 o 1 μ g/mL de HER2-Fc/100 ng/mL de anti-VEGF), se observaron aumentos fuertes en la expresión de CD69 y CD71 en células T que comprendían la construcción VEGFR2-28TM-CD28 en comparación con las células T que comprendían la construcción de control (es decir, la construcción de CAR denominada VEGFR), confirmando así la coestimulación de VEGFR2. Se observó una tendencia similar al comparar la expresión de CD69 y CD71 por las células T que

comprendían la construcción VEGFR2-CD28 en comparación con las células T que comprenden la construcción de control (es decir, la construcción de CAR denominada VEGFR).

Este ejemplo demuestra que se pueden generar células T CAR funcionales que comprenden dos CAR, con el dominio de señalización presente en un primer CAR, y los dominios coestimuladores presentes en un segundo CAR. Tales células T CAR son útiles en el tratamiento de enfermedades, p. ej., cáncer, donde es deseable utilizar un enfoque de señalización doble que se base en el reconocimiento de dos antígenos separados por los dos CAR.

5.5. Ejemplo 5: Linfocitos T modificados que tienen especificidad de antígeno doble

Este ejemplo describe la generación de linfocitos T modificados que comprenden CAR que se pueden utilizar en el enfoque de señalización doble descrito en la presente solicitud. Los linfocitos T modificados comprenden un primer receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión a antígeno específico para un antígeno específico de tumor y un segundo receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión a antígeno específico a un antígeno que no es un antígeno específico de tumor, pero que se asocia con tumorigénesis. En este Ejemplo, los dos CAR se introducen en las células T modificadas utilizando una sola construcción de CAR, con los CAR separados por P2A, lo que permite la expresión de dos CAR discretos (en cantidades esencialmente iguales) a partir de un solo ORF.

Las construcciones que comprenden CAR se representan en la Figura 4. La primera construcción, "CAR1", comprende un scFv anti-HER2, seguido de una bisagra de CD28, un dominio transmembrana (TM) de CD28, una cadena zeta de CD3, una secuencia T2A y un gen indicador tdTomato. "CAR2" comprende un scFv anti-HER2, seguido de una bisagra de CD28, un dominio transmembrana (TM) de CD28, un dominio IC de CD28, una cadena zeta de CD3, una secuencia T2A y un gen indicador tdTomato. "CAR3" comprende el dominio extracelular (EC) de VEGFR2 humano, seguido de un dominio TM de VEGFR2, una secuencia P2A, un scFv anti-HER2, una bisagra de CD28, un dominio transmembrana (TM) de CD28 y una cadena zeta de CD3. "CAR4" comprende el dominio extracelular (EC) de VEGFR2 humano, seguido de un dominio transmembrana (TM) de CD28, un dominio IC de CD28, un scFv anti-HER2, una bisagra de CD28, un dominio transmembrana (TM) de CD28 y una cadena zeta de CD3.

CAR1 representa un CAR anti-HER2 de primera generación que comprende un dominio de señalización primario (cadena zeta de CD3), pero carece de un dominio coestimulador. CAR 2 representa un CAR anti-HER2 de segunda generación que comprende tanto un dominio de señalización primario (cadena zeta de CD3) como un dominio coestimulador (dominio IC de CD28). CAR3 es una construcción de control CAR doble; comprende una porción de señalización primaria de HER2 (scFV contra HER2 y cadena zeta de CD3) y también comprende un dominio de señalización secundaria de VEGFR2, pero el dominio de señalización secundaria carece de un dominio coestimulador. CAR4 es una construcción de CAR doble; comprende una porción de señalización primaria de HER2 (scFV contra HER2 y cadena zeta de CD3) y también comprende un dominio de señalización secundaria VEGFR2 con un dominio coestimulador (IC de CD28).

Las células Pan T se aislaron como se describe anteriormente, se transfectaron con las construcciones de CAR (CAR1-CAR4) descritas anteriormente y se analizaron 24 horas después de la transducción. Se detectó la expresión de anti-HER2 en células T transfectadas con todas las construcciones de CAR. Se detectó la expresión de anti-HER2 y VEGFR2 en células T transfectadas con CAR3 o CAR4. Por lo tanto, se confirmó la expresión adecuada de las construcciones de CAR descritas anteriormente por las células T.

Una vez que se confirmó la expresión de las construcciones de CAR, las células T que expresaban las construcciones se cultivaron con HER2-Fc (0,25 ug/mL o 1,0 ug/mL) - para inducir la estimulación de las construcciones que contenían HER2-scFv (señalización primaria) - solo o combinado con un anticuerpo anti-VEGFR2 (0,25 ug/mL o 1,0 ug/mL) o VEGF (1, 10 o 100 ng/mL) - para inducir la estimulación de construcciones que contenían VEGFR2 (coestimulación). Se descubrió que la activación de VEGFR2 no alteraba la expresión de los marcadores de superficie de los marcadores de activación de células T CD69 o CD71 (según lo evaluado mediante citometría de flujo) en células T transfectadas con CAR1 o CAR2 sobre la estimulación observada con activación anti-HER2 sola.

En contraste, en las células T transfectadas con CAR4, la estimulación tanto con HER2-Fc como con anti-VEGFR2 dio como resultado una mejor expresión de CD69 en comparación con la expresión de CD69 en las células T CAR que expresan CAR4 estimuladas con HER2-Fc solo. Este aumento mediado por VEGFR2 de la regulación por incremento de la expresión de CD69 tras la estimulación con HER2-Fc no se observa en las células T transfectadas con la construcción de CAR de estimulación doble de control (CAR3) que carece de un dominio coestimulador en el CAR con VEGFR2 de la construcción (es decir, CAR3). En particular, 73,6% y 72,9% de las células T con CAR que expresan CAR4 expresaron CD69 cuando se estimularon con dosis de 0,25 ug/mL de HER2-Fc/0,25 ug/mL anti-VEGFR2 y de 0,25 ug/mL de HER2-Fc/1,0 ug/mL de anti-VEGFR2, respectivamente, en comparación con 33,4% de células T CAR que expresan CAR4 CD69⁺ estimuladas con 0,25 ug/mL de HER2-Fc solo; mientras que solo 6,13% y 3,69% de las células T CAR que expresan CAR3 expresaron CD69 cuando se estimularon con HER2-Fc y anti-VEGFR2 a las mismas dosis, respectivamente, en comparación con 4,9% de células T CAR que expresan CAR3 CD69⁺ estimuladas con 0,25 ug/mL de HER2-Fc solo. Se observó un resultado similar cuando se analizó la

5 expresión de CD71: 45,2% y 50,7% de las células T CAR que expresan CAR4 expresaron CD71 cuando se estimularon con dosis de 1,0 ug/mL de HER2-Fc/0,25 ug/mL de anti-VEGFR2 y de 1,0 ug/mL HER2-Fc/1,0 ug/mL anti-VEGFR2, respectivamente, en comparación con 22,8% de células T CAR que expresan CAR4 CD71⁺ estimuladas con 1,0 ug/mL de HER2-Fc solo; mientras que solo 7,80% y 7,89% de las células T CAR que expresan CAR3 expresaron CD71 cuando se estimularon con HER2-Fc y anti-VEGFR2 a las mismas dosis, respectivamente, en comparación con 10,3% de células T CAR que expresan CAR3 CD71⁺ estimuladas con 1,0 ug/mL de HER2-Fc solo.

10 Del mismo modo, en las células T transducidas con CAR4, la estimulación con HER2-Fc y VEGF dio como resultado una expresión mejorada de CD69 sobre los niveles de expresión de CD69 en las células T transducidas con la construcción de CAR con estimulación doble de control (CAR3) que carece de un dominio coestimulador en el CAR VEGFR2 de la construcción (es decir, CAR3). En particular, 35,3%, 48,2% y 48,5% de las células T CAR que expresan CAR4 expresaron CD69 cuando se estimularon con dosis de 0,25 ug/mL de HER2-Fc/1 ng/mL de VEGF, 0,25 ug/mL de HER2-Fc/10 ng/mL de VEGF y 0,25 ug/mL de HER2-Fc/100 ng/mL de VEGF, respectivamente, en comparación con 33,4% de células T CAR que expresan CAR4 CD69⁺ cuando se estimulan con 0,25 ug/mL de HER2-Fc solo; mientras que solo 3,40%, 2,69% y 2,55% de las células T CAR que expresan CAR3 expresaron CD69 cuando se estimularon con HER2-Fc y VEGF a las mismas dosis, respectivamente, en comparación con 4,9% de células T CAR que expresan CAR3 CD69⁺ estimuladas con 0,25 ug/mL de HER2-Fc solo. En términos de expresión de CD71, se determinó que 30,10%, 42,30% y 47,30% de las células T CAR que expresan CAR4 expresaban CD71 cuando se estimulaban con dosis de 1,0 ug/mL HER2-Fc/1 ng/mL VEGF, 1,0 ug/mL de HER2-Fc/10 ng/mL de VEGF y 1,0 ug/mL de HER2-Fc/100 ng/mL de VEGF, respectivamente, en comparación con 22,8% de células T CAR que expresan CAR4 CD71⁺ estimuladas con 1,0 ug/mL de HER2-Fc solo; mientras que solo 10,70%, 4,81% y 7,33% de las células T CAR que expresan CAR3 expresaron CD69 cuando se estimulaban con HER2-Fc y VEGF a las mismas dosis, respectivamente, en comparación con 10,3% de células T CAR que expresan CAR3 CD71⁺ estimuladas con 1,0 ug/mL de HER2-Fc solo.

25 La granzima B es una enzima presente en los gránulos de linfocitos T citotóxicos. Se evaluó la secreción de granzima B por las células T transfectadas con CAR1, CAR3 o CAR4. Las células T transfectadas con CAR4 expresaron mayores niveles de granzima B cuando se estimularon con HER2-Fc y anti-VEGFR2 a dosis de 0,25 ug/mL de HER2-Fc/0,25 ug/mL de anti-VEGFR2 y de 0,25 ug/mL de HER2-Fc/1,0 ug/mL anti-VEGFR2 en comparación con las células T transfectadas con cualquier CAR de control (CAR1 o CAR3). Del mismo modo, las células T transfectadas con CAR4 expresaron mayores niveles de granzima B cuando se estimularon con HER2-Fc y VEGF a dosis de 0,25 ug/mL de HER2-Fc/1ng/mL de VEGF y de 0,25 ug/mL de HER2-Fc/100 ng/mL de VEGF en comparación con las células T transfectadas con cualquier CAR de control (CAR1 o CAR3).

35 Se evaluó la viabilidad de las células T transfectadas con CAR1, CAR3 o CAR4 después de la estimulación con HER2-Fc combinado con un anticuerpo anti-VEGFR2 o VEGF. Las células Pan T se aislaron como se ha descrito. Después de 24 horas de cultivo, las células T se estimularon con HER2-Fc (1,0 ug/mL) y con anticuerpo anti-VEGFR2 (0,25 ug/mL o 1,0 ug/mL) o VEGF (1 ng/mL o 100 ng/mL) durante 48 horas. Después de 13 días totales de cultivo, se determinó la viabilidad de las células T. En cada caso, las células T transfectadas con CAR de estimulación doble (es decir, CAR4) mostraron una mayor viabilidad sobre las células T transfectadas con CAR de control doble (es decir, CAR3) o CAR de control designado CAR1.

40 Este ejemplo confirma el resultado del Ejemplo 4 - que se pueden generar células T CAR funcionales que comprenden dos CAR, con el dominio de señalización presente en un primer CAR, los dominios coestimuladores presentes en un segundo CAR - y demuestra adicionalmente que las dos construcciones de CAR se pueden expresar en las células T CAR como una construcción única (p. ej., pueden ser células T transfectadas con una construcción de CAR única que comprende los dos CAR).

REIVINDICACIONES

1. Un linfocito T modificado que comprende:

un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno y un primer dominio de señalización intracelular, en donde dicho primer polipéptido no comprende un dominio coestimulador,

en donde dicho primer dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de polipéptido que comprende un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM), en donde dicha secuencia de polipéptido es preferiblemente un dominio de señalización CD3 ζ , y

en donde dicho primer antígeno es:

(i) un antígeno sobre una célula tumoral, en donde dicha célula tumoral es preferiblemente una célula en un tumor sólido; o

(ii) un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor;

y

un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, o un receptor que se une a dicho segundo antígeno; y un segundo dominio de señalización intracelular, en donde dicho segundo polipéptido comprende uno o más dominios coestimuladores,

en donde dicho segundo antígeno es un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); y

en donde dichos uno o más dominios coestimuladores comprenden uno o más de una secuencia de polipéptido CD27 coestimulador, una secuencia de polipéptido CD28 coestimulador, una secuencia de polipéptido OX40 coestimulador (CD134), una secuencia de polipéptidos 4-1BB coestimulador (CD137), o una secuencia de polipéptido coestimulador de células T inducible por coestimulador (ICOS);

y

en donde dicho linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico solo cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

2. El linfocito T modificado de la reivindicación 1, en donde dicho antígeno asociado a tumor o antígeno específico de tumor es Her2, antígeno de células madre de próstata (PSCA), PSMA, BCMA, alfafetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de cáncer 125 (CA-125), CA19-9, calretinina, MUC-1, proteína de membrana epitelial (EMA), antígeno tumoral epitelial (ETA), tirosinasa, antígeno asociado a melanoma (MAGE), CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína del fluido de la enfermedad quística macroscópica (GCDFP-15), antígeno HMB-45, proteína melan-A (antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T; MART-1), myo-D1, actina específica de músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo 1, la forma dimérica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (M2-PK tumoral), CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRVIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prosteína, TARP (proteína de marco de lectura alternativo del receptor gamma de células T), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial con seis dominios transmembrana de próstata 1), una proteína ras anormal o una proteína p53 anormal .

3. El linfocito T modificado de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho primer dominio de unión a antígeno y dicho segundo dominio de unión a antígeno son independientemente una porción de unión a antígeno de un receptor o una porción de unión a antígeno de un anticuerpo.

4. El linfocito T modificado de la reivindicación 3, en donde dicho primer dominio de unión a antígeno y dicho segundo dominio de unión a antígeno son independientemente un fragmento de anticuerpo scFv.

5. El linfocito T modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho primer polipéptido comprende un dominio de señalización CD3 ζ .

6. El linfocito T modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho primer polipéptido y/o dicho segundo polipéptido comprenden un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-7 (IL-7R), un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-12, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-15, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-21 o un dominio de señalización intracelular del receptor del factor de crecimiento transformante β (TGF β).

7. El linfocito T modificado de la reivindicación 6, en donde dicho primer polipéptido es un dominio de señalización CD3 ζ , y en donde dicho segundo polipéptido comprende un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-7.

8. Un linfocito T modificado que comprende:

5 un primer polipéptido que comprende un primer dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un primer antígeno, y un primer dominio de señalización intracelular, en donde dicho primer polipéptido comprende uno o más dominios coestimuladores,

en donde dicho primer antígeno es:

(i) un antígeno sobre una célula tumoral, en donde dicha célula tumoral es preferiblemente una célula en un tumor sólido; o

10 (ii) un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor; y

en donde dichos uno o más dominios coestimuladores comprenden uno o más de una secuencia de polipéptido CD27 coestimulador, una secuencia de polipéptido CD28 coestimulador, una secuencia de polipéptido OX40 coestimulador (CD134), una secuencia de polipéptido 4-1BB coestimulador (CD137), o una secuencia de polipéptido coestimulador de células T inducible por coestimulador (ICOS);

15 y

un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio de unión a antígeno extracelular que se une a un segundo antígeno, o un receptor que se une a dicho segundo antígeno; y un segundo dominio de señalización intracelular, en donde dicho segundo polipéptido no comprende un dominio coestimulador,

en donde dicho segundo antígeno es un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); y

20 en donde dicho segundo dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de polipéptido que comprende un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM), en donde dicha secuencia de polipéptido es preferiblemente un dominio de señalización CD3 ζ ,

y

25 en donde linfocito modificado se vuelve máximamente citotóxico solo cuando dicho primer dominio de señalización y dicho segundo dominio de señalización son activados ambos por dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno, respectivamente.

9. El linfocito T modificado de la reivindicación 8, en donde dicho antígeno asociado a tumor o antígeno específico de tumor es Her2, antígeno de células madre de próstata (PSCA), PSMA, BCMA, alfafetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de cáncer 125 (CA-125), CA19-9, calretinina, MUC-1, proteína de membrana epitelial (EMA), antígeno tumoral epitelial (ETA), tirosinasa, antígeno asociado a melanoma (MAGE), CD34, CD45, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína del fluido de enfermedad quística macroscópica (GCDFP-15), antígeno HMB-45, proteína melan-A (antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T; MART-1), mio-D1, actina específica de músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria, sinaptofisina, tiroglobulina, factor de transcripción tiroideo 1, la forma dimérica de la isoenzima piruvato quinasa tipo M2 (M2-PK tumoral), CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (gangliósido G2), EGFRvIII (variante III del factor de crecimiento epidérmico), proteína espermática 17 (Sp17), mesotelina, PAP (fosfatasa ácida prostática), prostetina, TARP (proteína de marco de lectura alternativo del receptor gamma de células T), Trp-p8, STEAP1 (antígeno epitelial con seis dominios transmembrana de próstata 1), una proteína ras anormal o una proteína p53 anormal

40 10. El linfocito T modificado de la reivindicación 8 o 9, en donde dicho primer dominio de unión a antígeno y dicho segundo dominio de unión a antígeno son independientemente una porción de unión a antígeno de un receptor o una porción de unión a antígeno de un anticuerpo.

11. El linfocito T modificado de la reivindicación 10, en donde dicho primer dominio de unión a antígeno y dicho segundo dominio de unión a antígeno son independientemente un fragmento de anticuerpo scFv.

45 12. El linfocito T modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde dicho segundo polipéptido comprende un dominio de señalización CD3 ζ .

13. El linfocito T modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde dicho primer polipéptido y/o dicho segundo polipéptido comprenden un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-7 (IL-7R), un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-12, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-15, un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-21 o un dominio de señalización intracelular del receptor del factor de crecimiento transformante β (TGF β).

14. El linfocito T modificado de la reivindicación 13, en donde dicho primer polipéptido comprende un dominio de señalización intracelular del receptor de IL-7; y en donde dicho segundo polipéptido comprende un dominio de señalización CD3ζ.

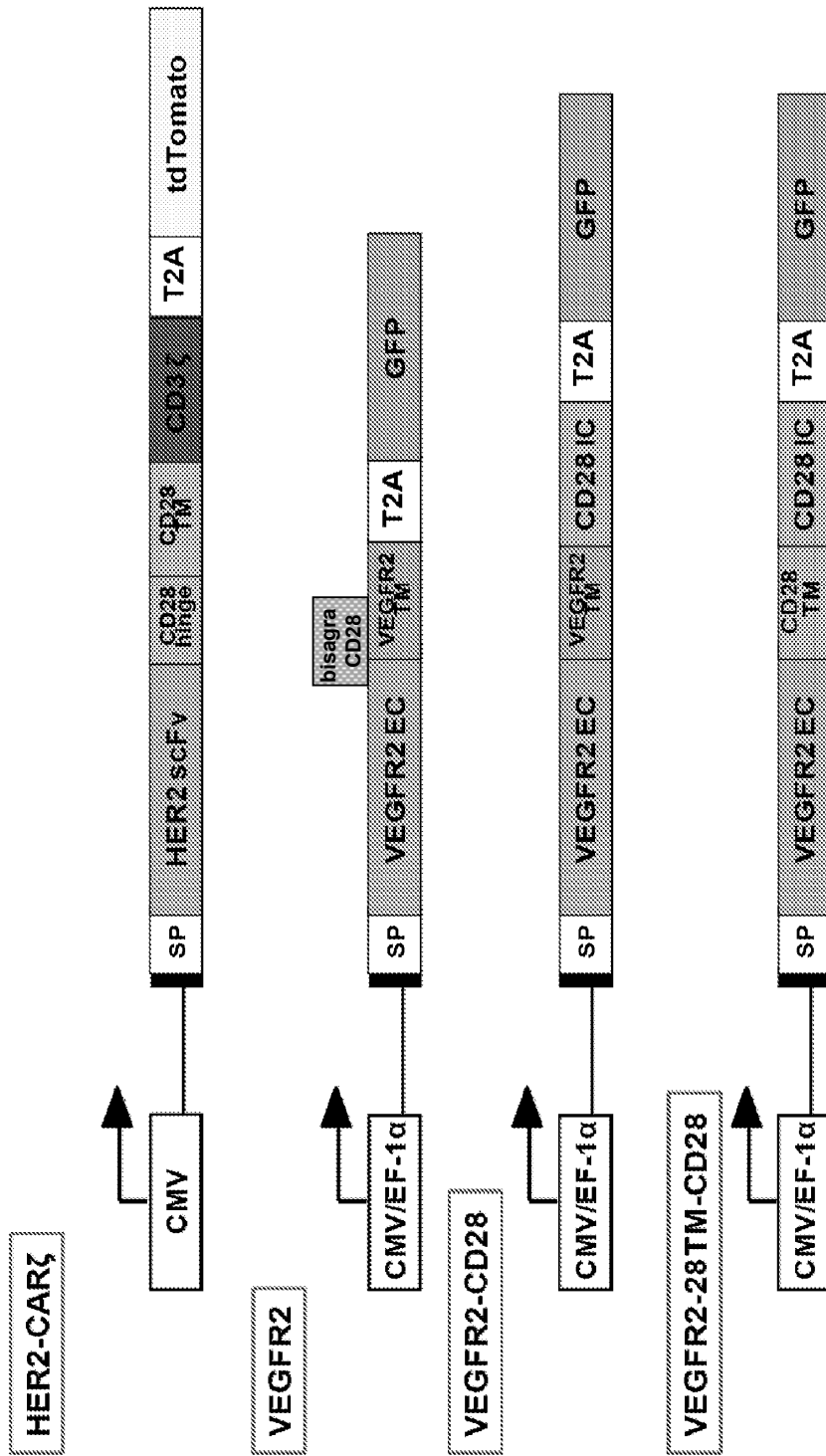


FIG. 1

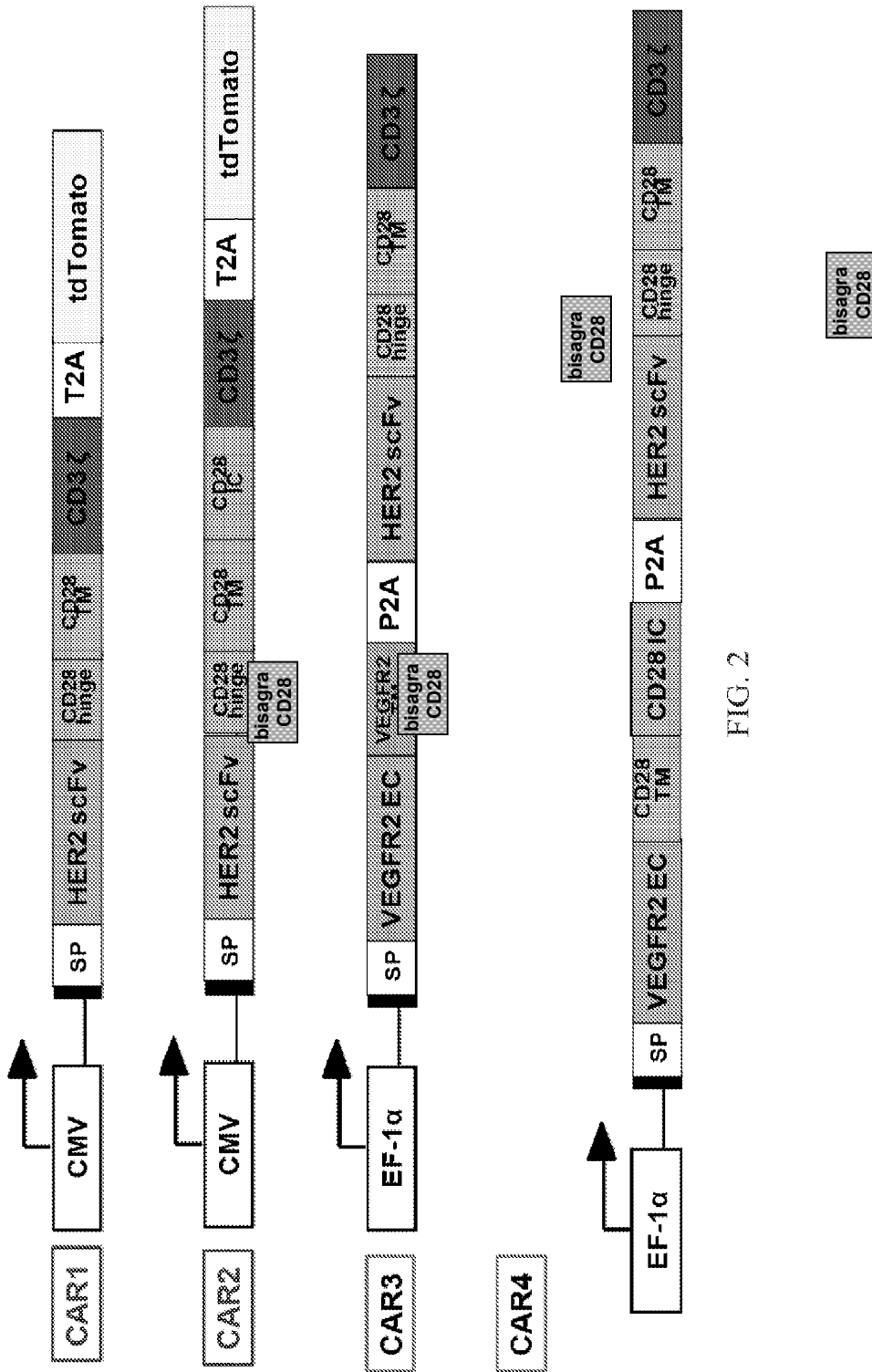


FIG. 2