(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 750 725**

(51) Int. CI.:

***C07K 16/28*** (2006.01)
***A61K 39/00*** (2006.01)
***C07K 14/005*** (2006.01)
***C07K 14/725*** (2006.01)
***A61K 48/00*** (2006.01)
***C12N 15/86*** (2006.01)
***C12N 15/62*** (2006.01)
***C12N 5/0783*** (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2015 PCT/US2015/064269**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2016 WO16094304**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2015 E 15868392 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 3230321**

(54) Título: **Receptores de antígeno quiméricos BCMA**

(30) Prioridad:

**12.12.2014 US 201462091419 P**
**03.08.2015 US 201562200505 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**26.03.2020**

(73) Titular/es:

**BLUEBIRD BIO, INC. (100.0%)**
**60 Binney Street**
**Cambridge, MA 02142, US**

(72) Inventor/es:

**MORGAN, RICHARD y**
**FRIEDMAN, KEVIN**

(74) Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

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

## DESCRIPCIÓN

Receptores de antígeno quiméricos BCMA

Antecedentes

Campo técnico

En el presente documento se describen composiciones y métodos mejorados para tratar afecciones relacionadas con células B. Más particularmente, se describen receptores de antígeno quiméricos (CAR) mejorados que comprenden anticuerpos anti-BCMA murinos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, células efectoras inmunes genéticamente modificadas para expresar estos CAR, y se divulga el uso de estas composiciones para tratar eficazmente afecciones relacionadas con células B.

Descripción de la técnica relacionada

Varias enfermedades importantes implican linfocitos B, es decir, células B. La fisiología anormal de las células B también puede conducir al desarrollo de enfermedades autoinmunes que incluyen, entre otras, el lupus eritematoso sistémico (LES). La transformación maligna de las células B conduce a cánceres que incluyen, entre otros, linfomas, por ejemplo, mieloma múltiple y linfoma no Hodgkin.

La gran mayoría de los pacientes con neoplasias malignas de células B, incluido el linfoma no Hodgkin (NHL) y el mieloma múltiple (MM), contribuyen de manera significativa a la mortalidad por cáncer. La respuesta de los tumores malignos de células B a diversas formas de tratamiento es mixta. Los métodos tradicionales de tratamiento de tumores malignos de células B, que incluyen quimioterapia y radioterapia, tienen una utilidad limitada debido a los efectos secundarios tóxicos. La inmunoterapia con anticuerpos terapéuticos anti-CD19, anti-CD20, anti-CD22, anti-CD23, anti-CD52, anti-CD80 y anti-HLA-DR ha proporcionado un éxito limitado, debido en parte a los pobres perfiles farmacocinéticos, la eliminación rápida de anticuerpos por proteasas séricas y filtración en el glomérulo, y penetración limitada en el sitio del tumor y niveles de expresión del antígeno diana en las células cancerosas. Los intentos de usar células genéticamente modificadas que expresan receptores de antígeno quiméricos (CAR) también han tenido un éxito limitado. Además, la eficacia terapéutica de un determinado dominio de unión al antígeno utilizado en un CAR es impredecible: si el dominio de unión al antígeno se une demasiado fuertemente, las células T CAR inducen la liberación masiva de citoquinas, lo que resulta en una reacción inmune potencialmente fatal considerada como "tormenta de citoquinas". y si el dominio de unión al antígeno se une demasiado débilmente, las células T CAR no muestran suficiente eficacia terapéutica para eliminar las células cancerosas.

WO 2013/154760 A1, Carpenter, R.O. et. al., Clin Cancer Res, vol. 19, no. 8, 2048-2060 (2013) y Wang, X, et. al., Blood, vol. 124, no. 21, resumen 1114 (2014) describen todos polinucleótidos que codifican anti-BCMA-CAR.

Breve resumen

En un primer aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido que codifica un CAR, en donde la secuencia de polinucleótidos se expone en la SEQ ID NO: 10.

Las realizaciones preferidas de la invención en cualquiera de sus diversos aspectos son como se describe a continuación o como se define en las reivindicaciones subordinadas.

Breve descripción de varias vistas de los dibujos

La Figura 1 muestra un esquema de construcciones CAR de antígeno de maduración de células B murinas (muBCMA).

La Figura 2a muestra la cantidad de IFNg liberado de las células T CAR anti-BCMA02, las células CART anti-BCMA10 y las células T CAR19Δ después de que las células se cultivaron conjuntamente durante 24 horas con células K562 que expresaban BCMA.

La Figura 2b muestra la cantidad de IFNg liberado de las células T CAR anti-BCMA02, las células CART anti-BCMA10 y las células T CAR19Δ después de que las células se cultivaron conjuntamente durante 24 horas con células K562 que carecen de expresión de BCMA en comparación con las células K562 que expresan BCMA.

La Figura 3 muestra la cantidad de citoquinas inflamatorias en los medios de crecimiento de células T de control no transducidas, células T CAR anti-BCMA02, células CART anti-BCMAlO y células T CAR19Δ, estimuladas 10 días antes del ensayo.

La Figura 4 muestra la cantidad de citoquinas inflamatorias producidas por las células T CAR anti-BCMA02, las células CART anti-BCMAlO y las células T CAR19Δ en ausencia de estimulación antigénica.

La Figura 5 muestra la expresión de marcadores fenotípicos de activación al final de la fabricación de células T CAR anti-BCMA. La expresión de HLA-DR y CD25 se midió en células T CAR anti-BCMA02, células T anti-BCMAlO CAR y células T CAR19Δ.

La Figura 6 muestra los niveles de caspasa-3 activada, un paso necesario en la apoptosis e importante para la AICD en las células CAR T anti-BCMA10 y las células CAR T anti-BCMA02 en ausencia de estimulación antigénica.

La Figura 7 muestra la cantidad de liberación de citoquinas inflamatorias en células T CAR anti-BCMA02 y anti-BCMAI0 en medios que contienen suero bovino fetal (FBS), suero AB humano (HABS) o BCMA soluble de 100 ng/ml.

La Figura 8A muestra el volumen del tumor en ratones NOD *scid* gamma (NSG) con tumores de mieloma múltiple humano subcutáneo experimental ~100 $mm^3$ (RPMI-8226). Los ratones fueron tratados con vehículo, $10^7$ células T CAR anti-BCMA02, $10^7$ células T CAR anti-BCMAIO, o Bortezomib (velcade).

La Figura 8B muestra el volumen tumoral en ratones NOD *scid* gamma (NSG) con ~100 $mm^3$ de mieloma múltiple humano subcutáneo experimental (RPMI-8226). Los ratones fueron tratados con vehículo, $10^7$ células T CAR anti-BCMA02, $10^7$ células T CAR anti-BCMAIO, o Bortezomib (velcade).

La Figura 9 muestra el nivel de expresión de BCMA en las líneas celulares (círculos) de linfoma y leucemia y la actividad de las células T CAR anti-BCMA en cada línea celular (liberación de IFNγ, cajas). Líneas celulares tumorales negativas para BCMA (BCMA): leucemia mielógena (K562), leucemia linfoblástica aguda (NALM-6 y NALM-16); linfoma de células del manto (REC-1); o el linfoma de Hodgkin (HDLM-2) mostraron poca o ninguna liberación de IFNy. Líneas celulares tumorales positivas para BCMA (BCMA+): leucemia linfoblástica crónica de células B (MEC-1), linfoma de células del manto (JeKo-1), linfoma de Hodgkin (RPMI-6666), linfoma de Burkitt (células de Daudi y células de Ramos) y el mieloma múltiple (RPMI-8226) mostraron una liberación sustancial de IFNy.

La Figura 10A muestra la actividad in vivo del vehículo, las células T CAR anti-CD19Δ, las células T CAR CAR-CD19 y las células CAR T anti-BCMA frente a BCMA que expresan las células de linfoma de Burkitt (células Daudi) en un modelo de ratón NSG cuando CAR T las células se administran a los ratones a los 8 días después de la inducción tumoral.

La Figura 10B muestra la actividad in vivo del vehículo, las células T CAR anti-CD19Δ, las células T CAR anti-CD19 y las células CAR T anti-BCMA con BCMA que expresan las células de linfoma de Burkitt (células Daudi) en un modelo de ratón NSG cuando las células T CAR se administran a los ratones a los 18 días después de la inducción tumoral.

La Figura 11 muestra la potente actividad in vitro de las células T CAR anti-BCMA logradas con una reducción del 50 por ciento de la expresión de anti-BCMA CAR. (A) Las poblaciones de células T se transdujeron con entre $4x10^8$ y $5x10^7$ unidades transductoras de un lentivirus que codifica una molécula anti-BCMA CAR (MOI de 5 a 40). Las poblaciones de células T resultantes se normalizaron para contener 26 ± 4% de células T positivas para BCMA anti-BCMA. (B) El MFI de las células T CAR anti-BCMA normalizadas osciló entre 885 y 1875 según se analizó mediante citometría de flujo. (C) Las células K562 y las células K562-BCMA se cultivaron conjuntamente con células T CAR anti-BCMA normalizadas en un efector 20:1 o 10:1 (E; célula T;) a la diana (T; mezcla: 1:1 de células K562 y K562 BCMA) mostró una actividad citolítica comparable.

La Figura 12 muestra la fiabilidad del proceso de fabricación de células T CAR anti-BCMA. (A) los productos de células T CAR anti-BCMA fabricados a partir de PBMC de 11 donantes individuales muestran niveles comparables de expansión en comparación con un cultivo compatible de células T de donantes no transducidas. (B) los productos de células T CAR anti-BCMA fabricados a partir de los 11 donantes mostraron una eficacia de transducción lentiviral (VCN) comparable. (C) La frecuencia de las células T positivas anti-BCMA CAR se midió por citometría de flujo y se encontró que la expresión de BCMA era comparable en todos los donantes. (D) Los productos de células T CAR anti-BCMA fabricados a partir de los 11 donantes mostraron niveles terapéuticamente relevantes de liberación de IFNγ cuando se expusieron a células K562 que expresan BCMA.

La Figura 13 muestra diagramas de Venn para la coexpresión de CD127, CD197 y CD38 en células T anti-BCMA02 positivas para CD62L que se han cultivado en presencia de IL-2 o IL-2 y ZSTK474 durante diez días. Las células T CAR anti-BCMA02 tratadas con ZSTK474 mostraron un aumento en el porcentaje de células que coexpresan CD127, CD197 y CD38 en comparación con las células T CAR anti-BCMA cultivadas con IL-2 solo.

La Figura 14 muestra un mayor porcentaje de células T CAR anti-BCMA02 que expresan CD8 en cultivos tratados con IL-2 y ZSTK474 (n=7) en comparación con cultivos tratados con IL-2 solo. La expresión de CD8 se determinó usando un anticuerpo anti-CD8 marcado con fluorescencia y citometría de flujo.

La Figura 15 muestra la cantidad de IFN-γ liberado por las células T CAR anti-BCMA02 de 14 donantes después del cultivo con IL-2 solo o con IL-2 y ZSTK474. Al final del período de cultivo, se volvió a cultivar un número equivalente de células T CAR anti-BCMA02 durante 24 horas en medio solo. La cantidad de IFN-γ liberada en 24 horas se cuantificó por ELISA. El cultivo en ZSTK474 no aumentó significativamente la liberación de citoquinas tónicas de células T CAR anti-BCMA02 en comparación con las células T-CAR anti-BCMA02 cultivadas con IL-2 sola.

La Figura 16 muestra la actividad antitumoral de células T CAR anti-BCMA02 tratadas con IL-2, o IL-2 y ZSTK474, o una célula T CAR anti-BCMA02 (tBCMA02) deficiente de señalización truncada tratada con IL-2 y ZSTK474 en un agresivo modelo de tumor Daudi. Se observó regresión tumoral completa en el 50% de los ratones a los que se administraron las células T CAR anti-BCMA02 tratadas con IL-2 y ZSTK474.

La Figura 17 muestra la actividad antitumoral de las células T CAR anti-BCMA02 tratadas con IL-2, o IL-2 y ZSTK474 en un modelo de tumor de mieloma múltiple (RPMI-8226). Los animales tratados con IL-2- o IL-2 y células T CAR anti-BCMA02 cultivadas con ZSTK474 impidieron completamente la proliferación tumoral.

Breve descripción de los identificadores de secuencia

Las SEQ ID NOs: 1-3 exponen secuencias de aminoácidos de secuencias CDR de cadena liviana de ejemplo para CAR BCMA contempladas en el presente documento.

Las SEQ ID NOs: 4-6 exponen secuencias de aminoácidos de secuencias de ejemplo de CDR de cadena pesada para BCMA CAR contempladas en el presente documento.

La SEQ ID NO: 7 expone una secuencia de aminoácidos de una secuencia de cadena liviana ejemplar para CAR BCMA contempladas en el presente documento.

La SEQ ID NO: 8 expone una secuencia de aminoácidos de secuencias de cadena pesada de ejemplo para CAR BCMA contempladas en el presente documento.

La SEQ ID NO: 9 expone una secuencia de aminoácidos de un CAR BCMA ejemplar contemplado en el presente documento.

La SEQ ID NO: 10 expone una secuencia de polinucleótidos que codifica un ejemplo de BCMA CAR contemplado en el presente documento.

SEQ ID NO: 11 establece la secuencia de aminoácidos del BCMA humano.

SEQ ID NO: 12-22 establecida para la secuencia de aminoácidos de diversos enlazadores.

SEQ ID NO: 23-35 establecida para la secuencia de aminoácidos de los sitios de escisión de proteasa y los sitios de escisión de polipéptidos autoescindibles.

SEQ ID NO: 36 conjuntos para la secuencia de polinucleótidos de un vector que codifica un CAR BCMA.

Descripción detallada

A. Visión general

En el presente documento se describen composiciones y métodos mejorados para tratar afecciones relacionadas con células B. Como se usa en este documento, el término "afecciones relacionadas con células B" se refiere a afecciones que implican actividad inapropiada de células B y tumores malignos de células B.

En particular, la descripción se refiere a una terapia celular adoptiva mejorada de afecciones relacionadas con células B usando células efectoras inmunes modificadas genéticamente. Los enfoques genéticos ofrecen un medio potencial para mejorar el reconocimiento inmune y la eliminación de las células cancerosas. Una estrategia prometedora es diseñar genéticamente las células efectoras inmunes para expresar los receptores de antígeno quiméricos (CAR) que redirigen la citotoxicidad hacia las células cancerosas. Sin embargo, las inmunoterapias de células adoptivas existentes para tratar los trastornos de las células B presentan un riesgo grave de comprometer la inmunidad humoral porque las células se dirigen a los antígenos expresados en todas o en la mayoría de las células B. Por consiguiente, tales terapias no son clínicamente deseables y, por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de terapias más eficientes para afecciones relacionadas con células B que sostengan la inmunidad humoral.

Las composiciones y métodos mejorados de terapia celular adoptiva descritos en el presente documento, proporcionan células efectoras inmunes modificadas genéticamente que pueden expandirse fácilmente, exhiben persistencia a largo plazo in vivo y reducen el deterioro de la inmunidad humoral dirigiéndose al antígeno de maduración de células B (BCMA, también conocido como CD269 o superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 17; TNFRSF17).

El BCMA es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (véase, por ejemplo, Thompson et al., J. Exp. Medicine, 192(1): 129-135, 2000, y Mackay et al., Annu. Rev Immunol, 21: 231-264, 2003. BCMA une el factor activador de células B (BAFF) y un ligando inductor de proliferación (APRIL) (véase, por ejemplo, Mackay et al., 2003 y Kalled et al., Immunological Reviews, 204: 43-54, 2005). Entre las células no malignas, se ha informado que BCMA se expresa principalmente en células plasmáticas y subconjuntos de células B maduras (véase, por ejemplo, Laabi et al., EMBO J., 77(1): 3897-3904, 1992; Laabi et al., Nucleic Acids Res., 22(7): 1147-1154, 1994; Kalled et al., 2005; O'Connor et al., J. Exp. Medicine, 199(1): 91-97, 2004 y Ng et al., J. Immunol., 73(2): 807-817, 2004. Los ratones con deficiencia de BCMA son sanos y tienen un número normal de células B, pero la supervivencia de las células plasmáticas vivas está alterada (véase, por ejemplo, O'Connor et al., 2004; Xu et al., Mol. Cell. Biol, 21(12): 4067-4074, 2001; y Schiemann et al., Science, 293(5537): 2 111-21 14, 2001). El ARN de BCMA se ha detectado universalmente en células de mieloma múltiple y en otros linfomas, y varios investigadores han detectado la proteína de BCMA en la superficie de las células plasmáticas de pacientes con mieloma múltiple (véase, por ejemplo, Novak

et al., Blood, 103(2): 689-694, 2004; Neri et al., Clinical Cancer Research, 73(19): 5903-5909, 2007; Bellucci et al., Blood, 105(10): 3945-3950, 2005; y Moreaux et al., Blood, 703(8): 3148-3157, 2004.

Los CAR que comprenden secuencias de anticuerpos murinos anti-BCMA pueden ser altamente eficaces en comparación con los CAR BCMA que comprenden secuencias de anticuerpos humanos particulares; puede sufrir una fuerte expansión in vivo; y reconocer las células B humanas que expresan BMCA; puede mostrar actividad citotóxica contra las células B que expresan BCMA; y puede mostrar signos de inducir una tormenta de citoquinas, una condición potencialmente mortal en donde las citoquinas liberadas por las células T activadas crean una respuesta inflamatoria repentina en el sistema que provoca una fiebre no infecciosa.

En particular, se proporciona un CAR que comprende un anticuerpo murino anti-BCMA o un fragmento de unión a antígeno, un dominio transmembrana y uno o más dominios de señalización intracelular.

En particular, se proporciona una célula efectora inmune genéticamente para expresar un CAR contemplado en el presente documento. Las células T que expresan un CAR se denominan en el presente documento células T CAR o células T modificadas con CAR.

Las células efectoras inmunes modificadas genéticamente contempladas en el presente documento, se pueden administrar a un paciente con una afección relacionada con células B, por ejemplo, una enfermedad autoinmune asociada con células B o una neoplasia maligna de células B.

La práctica de la presente divulgación empleará, a menos que se indique específicamente lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, química orgánica, biología molecular, microbiología, técnicas de ADN recombinante, genética, inmunología y biología celular que están dentro de la habilidad. del arte, muchos de los cuales se describen a continuación con fines ilustrativos. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition, 2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, actualizado en julio de 2008); Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Asociados and Wiley-Interscience; Glover, DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I y II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, Nueva York, 1992); Transcription and Translation (B. Hames y S. Higgins, Eds., 1984); A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); Harlow and Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) Current Protocols in Immunology Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach y W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology*; así como monografías en revistas como Advances in Immunology.

B. Definiciones

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que los entendidos habitualmente en la técnica. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento se puede usar en la práctica o prueba de la presente divulgación, se describen en el presente documento realizaciones preferidas de composiciones, métodos y materiales. A los fines de la presente divulgación, los siguientes términos se definen a continuación.

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

El uso de la alternativa (por ejemplo, "o") debe entenderse con el significado de una, ambas o cualquier combinación de las mismas.

El término "y/o" debe entenderse con el significado de una o ambas alternativas.

Como se usa en el presente documento, el término "alrededor de" o "aproximadamente" se refiere a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía hasta en un 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% con respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia. El término "alrededor de" o "aproximadamente" puede referirse a un rango de cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud ±15%, ±10%, ±9%, ±8%, ±7%, ±6%, ±5%, ±4%, ±3%, ±2% o ±1% sobre una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

A lo largo de esta especificación, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que las palabras "comprenden", "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de un paso o elemento establecido o un grupo de pasos o elementos, pero no la exclusión de cualquier otro paso o elemento o grupo de pasos o elementos. Por "consistente en" se entiende incluyendo, y limitado a, lo que sigue a la expresión "consistente en". Por lo tanto, la expresión "consistente en" indica que los elementos enumerados son requeridos u mandatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos. Por "que consiste esencialmente en" se entiende cualquier elemento enumerado después de la expresión, y limitado a otros elementos que no interfieren con la actividad o acción especificada en la

divulgación de los elementos enumerados ni contribuyen a ella. Por lo tanto, la expresión "consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados son requeridos o mandatorios, pero que no hay otros elementos presentes que afecten materialmente la actividad o acción de los elementos enumerados.

La referencia a lo largo de esta especificación a "una realización", "alguna realización", "una realización particular", "una realización relacionada", "una determinada realización", "una realización adicional" o "una realización posterior" o combinaciones de los mismos significa que un rasgo, estructura o característica particular descrito en relación con la realización está incluida en al menos una realización de la presente invención. Por lo tanto, las apariencias de las expresiones anteriores en varios lugares a lo largo de esta especificación no se refieren necesariamente a la misma realización. Además, los rasgos, estructuras o características particulares se pueden combinar de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones. También se entiende que la citación positiva de una característica en una realización sirve como base para excluir la característica en una realización particular.

C. Receptores de antígeno quiméricos

Se proporcionan receptores genéticamente modificados que redirigen la citotoxicidad de las células efectoras inmunes hacia las células B. Estos receptores genéticamente modificados denominados en este documento receptores de antígeno quiméricos (CAR). Los CAR son moléculas que combinan la especificidad basada en anticuerpos para un antígeno deseado (por ejemplo, BCMA) con un dominio intracelular que activa el receptor de células T para generar una proteína quimérica que exhibe una actividad inmune celular anti-BCMA específica. Como se usa en el presente documento, el término "quimérico" describe estar compuesto de partes de diferentes proteínas o ADN de diferentes orígenes.

Los CAR contemplados en el presente documento comprenden un dominio extracelular (también denominado dominio de unión o dominio de unión específico de antígeno) que se une a BCMA, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. La participación del dominio de unión al antígeno anti-BCMA de la CAR con BCMA en la superficie de una célula diana da como resultado la agrupación de la CAR y proporciona un estímulo de activación a la célula que contiene la CAR. La característica principal de los CAR es su capacidad para redirigir la especificidad de las células efectoras inmunes, lo que desencadena la proliferación, la producción de citoquinas, la fagocitosis o la producción de moléculas que pueden mediar la muerte celular de la célula que expresa el antígeno diana de manera independiente de la histocompatibilidad principal (MHC), explotando capacidades de direccionamiento específico de células de anticuerpos monoclonales, ligandos solubles o correceptores específicos de células.

Un CAR puede comprender un dominio de unión extracelular que comprende un dominio de unión específico anti-BCMA murino; un dominio transmembrana; uno o más dominios de señalización coestimuladores intracelulares; y un dominio de señalización primario.

Un CAR puede comprender un dominio de unión extracelular que comprende un anticuerpo anti-BCMA murino o un fragmento de unión a antígeno del mismo; uno o más dominios bisagra o dominios espaciadores; un dominio transmembrana que incluye; uno o más dominios de señalización coestimuladores intracelulares; y un dominio de señalización primario.

1. Dominio de unión

Los CAR contemplados en el presente documento pueden comprender un dominio de unión extracelular que comprende un anticuerpo anti-BCMA murino o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un polipéptido BCMA humano expresado en una célula B. Como se usa en el presente documento, los términos "dominio de unión", "dominio extracelular", "dominio de unión extracelular", "dominio de unión específica de antígeno" y "dominio de unión específica de antígeno extracelular" se usan indistintamente y proporcionan un CAR con la capacidad para unirse específicamente al antígeno objetivo de interés, por ejemplo, BCMA. El dominio de unión puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante.

Los términos "afinidad de unión específica" o "se une específicamente" o "unido específicamente" o "unión específica" o "dianas específicas" como se usa en el presente documento, describe la unión de un anticuerpo anti-BCMA o un fragmento de unión a antígeno del mismo (o un CAR que comprende lo mismo) a BCMA con mayor afinidad de unión que la unión de fondo. Un dominio de unión (o un CAR que comprende un dominio de unión o una proteína de fusión que contiene un dominio de unión) "se une específicamente" a un BCMA si se une o se asocia con BCMA con una afinidad o $K_a$ (es decir, una constante de asociación de equilibrio de una particular interacción de unión con unidades de 1/M) de, por ejemplo, mayor o igual que aproximadamente $10^5$ $M^{-1}$. Un dominio de unión puede (o una proteína de fusión del mismo) unirse a un objetivo con un $K_a$ mayor o igual a aproximadamente $10^6$ $M^{-1}$, $10^7$ $M^{-1}$, $10^8$ $M^{-1}$, $10^9$ $M^{-1}$, $10^{10}$ $M^{-1}$, $10^{11}$ $M^{-1}$, $10^{12}$ $M^{-1}$ o $10^{13}$ $M^{-1}$. Los dominios de unión de "alta afinidad" (o proteínas de fusión de cadena única de los mismos) se refieren a aquellos dominios de unión con un $K_a$ de al menos $10^7$ $M^{-1}$, al menos $10^8$ $M^{-1}$, al menos $10^9$ $M^{-1}$, al menos $10^{10}$ $M^{-1}$, al menos $10^{11}$ $M^{-1}$, al menos $10^{12}$ $M^{-1}$, al menos $10^{13}$ $M^{-1}$ o mayor.

Como alternativa, la afinidad se puede definir como una constante de disociación de equilibrio ($K_d$) de una interacción de unión particular con unidades de M (por ejemplo, $10^{-5}$ M a $10^{-13}$ M, o menos). Las afinidades de los polipéptidos de dominio de unión y las proteínas CAR de acuerdo con la presente divulgación se pueden determinar fácilmente usando técnicas convencionales, por ejemplo, mediante ELISA competitivo (ensayo de inmunosorción ligada a enzimas), o

mediante asociación de unión, o ensayos de desplazamiento usando ligandos marcados, o usando una superficie - dispositivo de resonancia de plasma como el Biacore T100, que está disponible en Biacore, Inc., Piscataway, NJ, o tecnología de biosensores ópticos como el sistema EPIC o EnSpire que están disponibles en Corning y Perkin Elmer respectivamente (véase también, por ejemplo, Scatchard et al. (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51: 660 y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,283,173; 5,468,614, o su equivalente.

La afinidad de la unión específica puede ser aproximadamente 2 veces mayor que la unión de fondo, aproximadamente 5 veces mayor que la unión de fondo, aproximadamente 10 veces mayor que la unión de fondo, aproximadamente 20 veces mayor que la unión de fondo, aproximadamente 50 veces mayor que la unión de fondo, aproximadamente 100 veces mayor que la unión de fondo, o aproximadamente 1000 veces mayor que la unión de fondo o más.

El dominio de unión extracelular de un CAR puede comprender un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Un "anticuerpo" se refiere a un agente de unión que es un polipéptido que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena liviana o cadena pesada que reconoce y se une específicamente a un epítopo de un antígeno, como un péptido, lípido, polisacárido o ácido nucleico que contiene un determinante antigénico, como los reconocidos por una célula inmune.

Un "antígeno (Ag)" se refiere a un compuesto, composición o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de células T en un animal, incluidas las composiciones (como una que incluye una proteína específica para el cáncer) que son inyectados o absorbidos en un animal. Un antígeno reacciona con los productos de inmunidad humoral o celular específica, incluidos los inducidos por antígenos heterólogos, como los antígenos descritos. El antígeno objetivo puede ser un epítopo de un polipéptido BCMA.

Un "epítopo" o "determinante antigénico" se refiere a la región de un antígeno al que se une un agente de unión. Los epítopos se pueden formar tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente en la exposición a disolventes desnaturalizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente en el tratamiento con disolventes desnaturalizantes. Un epítopo típicamente incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5, aproximadamente 9, o aproximadamente 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

Los anticuerpos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos, tales como Camel Ig, Ig NAR, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos $F(ab)'_2$, fragmentos $F(ab)'_3$, Fv, proteínas Fv de cadena única ("scFv"), bis-scFv, $(scFv)_2$, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, proteínas Fv estabilizadas con disulfuro ("dsFv") y anticuerpos de dominio único (sdAb, nanocuerpo) y porciones de anticuerpos de longitud completa responsables de la unión al antígeno. El término también incluye formas genéticamente modificadas, tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados), anticuerpos heteroconjugados (como anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Véase también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

Como entenderá el experto en la materia y como se describe en otra parte en el presente documento, un anticuerpo completo comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas. Cada cadena pesada consta de una región variable y una primera, segunda y tercera región constante, mientras que cada cadena liviana consta de una región variable y una región constante. Las cadenas pesadas de mamíferos se clasifican como α, δ, ε, γ y μ. Las cadenas livianas de mamíferos se clasifican como λ o κ. Las inmunoglobulinas que comprenden las cadenas pesadas α, δ, ε, γ y μ se clasifican como inmunoglobulina (Ig)A, IgD, IgE, IgG e IgM. El anticuerpo completo forma una forma de "Y". El tallo de la Y consiste en la segunda y tercera regiones constantes (y para IgE e IgM, la cuarta región constante) de dos cadenas pesadas unidas entre sí y se forman enlaces disulfuro (entre cadenas) en la bisagra. Las cadenas pesadas γ, α y δ tienen una región constante compuesta de tres dominios Ig en tándem (en una línea) y una región bisagra para mayor flexibilidad; las cadenas pesadas μ y ε tienen una región constante compuesta de cuatro dominios de inmunoglobulina. Las regiones constantes segunda y tercera se denominan "dominio CH2" y "dominio CH3", respectivamente. Cada brazo de la Y incluye la región variable y la primera región constante de una sola cadena pesada unida a las regiones variables y constantes de una sola cadena liviana. Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada son responsables de la unión al antígeno.

Las regiones variables de la cadena liviana y pesada contienen una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables, también llamadas "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". Las CDR se pueden definir o identificar por métodos convencionales, como por secuencia de acuerdo con Kabat et al (Wu, TT and Kabat, E.A., J Exp Med. 132(2): 211-50, (1970); Borden, P. and Kabat E.A., PNAS, 84: 2440-2443 (1987); (véase Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, 1991), o por estructura según Chothia et al (Choithia, C. and Lesk, A.M., J Mol. Biol., 196(4): 901-917 (1987), Choithia, C. et al., Nature, 342: 877-883 (1989)).

Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas livianas o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie, como los humanos. La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas livianas y pesadas constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional. Las CDR son las principales responsables de la unión a un epítopo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se

denominan típicamente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente a partir del extremo N, y también se identifican típicamente por la cadena en donde se encuentra la CDR particular. Por lo tanto, las CDR ubicadas en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo se denominan CDRH1, CDRH2 y CDRH3, mientras que las CDR ubicadas en el dominio variable de la cadena liviana del anticuerpo se denominan CDRL1, CDRL2, y CDRL3. Los anticuerpos con diferentes especificidades (es decir, diferentes sitios de combinación para diferentes antígenos) tienen diferentes CDR. Aunque son las CDR las que varían de un anticuerpo a otro, solo un número limitado de posiciones de aminoácidos dentro de las CDR están directamente involucradas en la unión al antígeno. Estas posiciones dentro de las CDR se denominan residuos determinantes de especificidad (SDR). Ejemplos ilustrativos de CDR de cadena liviana que son adecuados para construir CAR BCMA humanizados contemplados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, las secuencias de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 1-3. Ejemplos ilustrativos de CDR de cadena pesada que son adecuados para construir CAR BCMA humanizados contemplados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, las secuencias de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 4-6.

Las referencias a "$V_H$" o "VH" se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye la de un anticuerpo, Fv, scFv, dsFv, Fab u otro fragmento de anticuerpo como se describe en este documento. Las referencias a "$V_L$" o "VL" se refieren a la región variable de una cadena liviana de inmunoglobulina, que incluye la de un anticuerpo, Fv, scFv, dsFv, Fab u otro fragmento de anticuerpo como se describe en este documento.

Un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo producido por un solo clon de linfocitos B o por una célula en donde se han transfectado los genes de cadena liviana y pesada de un solo anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, haciendo células híbridas formadoras de anticuerpos a partir de una fusión de células de mieloma con células inmunes del bazo. Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados.

Un "anticuerpo quimérico" tiene residuos marco de una especie, tal como humanos, y CDR (que generalmente confieren unión a antígeno) de otra especie, tal como un ratón. Un CAR contemplado en el presente documento puede comprender un dominio de unión específica de antígeno que es un anticuerpo quimérico o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Un anticuerpo "humanizado" es una inmunoglobulina que incluye una región marco humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, un ratón, rata o sintética). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina "donante", y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se denomina "aceptador".

Un anticuerpo anti-BCMA murino o un fragmento de unión a antígeno del mismo, puede incluir, pero no se limita a, un Camel Ig (un anticuerpo de camélido (VHH)), Ig NAR, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos $F(ab)'_2$, fragmentos $F(ab)'_3$, Fv, anticuerpo Fv de cadena sencilla ("scFv"), bis-scFv, (scFv)2, minicuerpo, diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, proteína Fv estabilizada con disulfuro ("dsFv"), y anticuerpo de dominio único (sdAb, nanocuerpo).

"Camel Ig" o "camélido VHH", como se usa en el presente documento, se refiere a la unidad de unión a antígeno más pequeña conocida de un anticuerpo de cadena pesada (Koch-Nolte, et al, FASEB J., 21: 3490-3498 (2007)). Un "anticuerpo de cadena pesada" o un "anticuerpo de camélido" se refiere a un anticuerpo que contiene dos dominios VH y no cadenas livianas (Riechmann L. et al., J. Immunol. Methods 231: 25-38 (1999); WO94/04678; WO94/25591; Patente de los Estados Unidos No. 6,005,079).

"IgNAR" del "nuevo receptor de antígeno de inmunoglobulina" se refiere a la clase de anticuerpos del repertorio inmune de tiburón que consiste en homodímeros de un dominio de receptor de antígeno nuevo variable (VNAR) y cinco dominios de receptor de antígeno nuevo (CNAR) constantes. Los IgNAR representan algunos de los andamios de proteínas basados en inmunoglobulina más pequeños conocidos y son altamente estables y poseen características de unión eficientes. La estabilidad inherente se puede atribuir tanto a (i) el andamiaje de Ig subyacente, que presenta un número considerable de residuos expuestos a la superficie cargados e hidrófilos en comparación con los dominios convencionales de anticuerpos VH y VL encontrados en anticuerpos murinos; y (ii) características estructurales estabilizadoras en los bucles de la región determinante complementaria (CDR) que incluyen puentes disulfuro entre bucles y patrones de enlaces de hidrógeno dentro de bucles.

La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento residual "Fc", cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y todavía es capaz de entrecruzar el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de unión a antígeno. En una realización, una especie Fv de dos cadenas consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno ligero en asociación estrecha, no covalente. En una especie de Fv de cadena sencilla (scFv), un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena liviana se puede unir covalentemente mediante un enlazante peptídico flexible de modo que las cadenas ligera y pesada se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie Fv de dos cadenas. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables (HVR) de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, los seis HVR confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable único (o la mitad de un Fv

que comprende solo tres HVR específicos para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de la cadena pesada y ligera y también contiene el dominio constante de la cadena liviana y el primer dominio constante (CHI) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada, que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación aquí para Fab' en que los residuos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')2 originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena liviana (VL) en la misma cadena de polipéptidos (VH-VL). Al usar un enlazante que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Medicina. 9: 129-134 (2003); y Hollinger et al., PNAS USA 90: 6444-6448 (1993). Triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson et al., Nat. Medicina. 9: 129-134 (2003).

"Anticuerpo de dominio único" o "sdAb" o "nanocuerpo" se refiere a un fragmento de anticuerpo que consiste en la región variable de una cadena pesada de anticuerpo (dominio VH) o la región variable de una cadena liviana de anticuerpo (dominio VL) (Holt, L., et al, Trends in Biotechnology, 21(11): 484-490).

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios de anticuerpo VH y VL, en donde estos dominios están presentes en una cadena de polipéptidos única y en cualquier orientación (por ejemplo, VL-VH o VH-VL). Generalmente, el polipéptido scFv comprende además un enlazante de polipéptido entre los dominios VH y VL que permite que scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en The Pharmacology of Monoclonal Anticuerpos, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York, 1994), págs. 269-315.

Un CAR contemplado en el presente documento puede comprender un dominio de unión específico de antígeno que es un scFv murino. Los anticuerpos de cadena sencilla pueden clonarse de los genes de la región V de un hibridoma específico para un objetivo deseado. La producción de tales hibridomas se ha convertido en rutina. Una técnica que puede usarse para clonar la cadena pesada de la región variable (VH) y la cadena liviana de la región variable (VL) se ha descrito, por ejemplo, en Orlandi et al., PNAS, 1989; 86: 3833-3837.

El dominio de unión específica de antígeno puede ser un scFv murino que se une a un polipéptido BCMA humano. Ejemplos ilustrativos de cadenas pesadas variables que son adecuadas para construir CAR BCMA contemplados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 8. Ejemplos ilustrativos de cadenas livianas variables que son adecuadas para construir CAR BCMA contemplados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO: 7.

Los dominios de unión específicos de BCMA proporcionados en el presente documento también comprenden una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR. Dichos CDR pueden ser CDR no humanos o CDR no humanos alterados seleccionados de CDRL1, CDRL2 y CDRL3 de la cadena liviana y CDRH1, CDRH2 y CDRH3 de la cadena pesada. En ciertas realizaciones, un dominio de unión específico de BCMA comprende (a) una región variable de cadena liviana que comprende una cadena liviana CDRL1, una cadena liviana CDRL2 y una cadena liviana CDRL3, y (b) una región variable de cadena pesada que comprende una cadena pesada cadena CDRH1, una cadena pesada CDRH2 y una cadena pesada CDRH3.

2. Enlazadores

Los CAR contemplados en el presente documento pueden comprender residuos enlazadores entre los diversos dominios, por ejemplo, añadidos para la separación y conformación apropiadas de la molécula. El enlazador puede ser una secuencia de enlace de región variable. Una "secuencia de enlace de región variable" es una secuencia de aminoácidos que conecta los dominios VH y VL y proporciona una función espaciadora compatible con la interacción de los dos dominios de subunión para que el polipéptido resultante conserve una afinidad de unión específica a la misma molécula objetivo como un anticuerpo que comprende las mismas regiones variables de cadena liviana y pesada. Los CAR contemplados en el presente documento pueden comprender uno, dos, tres, cuatro o cinco o más enlazadores. La longitud de un enlazador puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 aminoácidos, de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 aminoácidos, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos, o cualquier longitud intermedia de aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más aminoácidos de largo.

Ejemplos ilustrativos de enlazadores incluyen polímeros de glicina $(G)_n$; polímeros de glicina-serina $(G_{1-5}S_{1-5})_n$, donde n es un número entero de al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco; polímeros de glicina-alanina; polímeros de alanina-serina; y otros enlazadores flexibles conocidos en la técnica. Los polímeros de glicina y glicina-serina están

relativamente desestructurados y, por lo tanto, pueden servir como un enlace neutro entre dominios de proteínas de fusión, como el CAR descritos en este documento. La glicina accede significativamente más espacio phi-psi que incluso la alanina, y es mucho menos restringida que los residuos con cadenas laterales más largas (véase Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). El experto en la materia normalmente reconocerá que el diseño de un CAR en realizaciones particulares puede incluir enlazantes que son total o parcialmente flexibles, de modo que el enlazante puede incluir un enlazante flexible, así como una o más porciones que confieren una estructura menos flexible para proporcionar una estructura del CAR deseado.

Otros enlazadores de ejemplo incluyen, pero no se limitan a las siguientes secuencias de aminoácidos: GGG; DGGGS (SEQ ID NO: 12); TGEKP (SEQ ID NO: 13) (véase, por ejemplo, Liu et al., PNAS 5525-5530 (1997)); GGRR (SEQ ID NO: 14) (Pomerantz et al. 1995, supra); $(GGGGS)_n$ en donde = 1, 2, 3, 4 o 5 (SEQ ID NO: 15) (Kim et al., PNAS 93, 1156-1160 (1996.); EGKSSGSGSESKVD (SEQ ID NO: 16) (Chaudhary et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1066-1070); KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 17) (Bird et al., 1988, Science 242: 423-426), GGRRGGGS (SEQ ID NO: 18); LRQRDGERP (SEQ ID NO: 19); LRQKDGGGSERP (SEQ ID NO: 20); LRQKd $(GGGS)_2$ ERP (SEQ ID NO: 21). Alternativamente, los enlazadores flexibles pueden diseñarse racionalmente utilizando un programa informático capaz de modelando tanto los sitios de unión al ADN como los péptidos mismos (Desjarlais & Berg, PNAS 90: 2256-2260 (1993), PNAS 91: 11099-11103 (1994) o por métodos de visualización de fagos. En una realización, el enlazante comprende el siguiente amino secuencia ácida: GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 22) (Cooper et al., Blood, 101(4): 1637-1644 (2003)).

3. Dominio espaciador

El dominio de unión del CAR puede estar seguido por uno o más "dominios espaciadores", que se refiere a la región que aleja el dominio de unión al antígeno de la superficie de la célula efectora para permitir el contacto apropiado célula/célula, la unión al antígeno y la activación (Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). El dominio bisagra puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. Un dominio espaciador puede ser una porción de una inmunoglobulina, que incluye, pero no se limita a, una o más regiones constantes de la cadena pesada, por ejemplo, CH2 y CH3. El dominio espaciador puede incluir la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de inmunoglobulina natural o una región bisagra de inmunoglobulina alterada.

El dominio espaciador puede comprender los dominios CH2 y CH3 de IgG1 o IgG4.

4. Dominio bisagra

El dominio de unión del CAR generalmente está seguido por uno o más "dominios bisagra", que desempeñan un papel en el posicionamiento del dominio de unión al antígeno lejos de la superficie de la célula efectora para permitir el contacto apropiado entre células/células, la unión al antígeno y la activación. Un CAR generalmente comprende uno o más dominios bisagra entre el dominio de unión y el dominio transmembrana (TM). El dominio bisagra puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. El dominio bisagra puede incluir la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de inmunoglobulina natural o una región bisagra de inmunoglobulina alterada.

Una "región bisagra alterada" se refiere a (a) una región bisagra natural con hasta 30% de cambios de aminoácidos (por ejemplo, hasta 25%, 20%, 15%, 10% o 5% de sustituciones de aminoácidos) o eliminaciones), (b) una porción de una región bisagra natural que tiene al menos 10 aminoácidos (por ejemplo, al menos 12, 13, 14 o 15 aminoácidos) de longitud con hasta 30% de cambios de aminoácidos (por ejemplo, hasta 25%, 20%, 15%, 10% o 5% de sustituciones o eliminaciones de aminoácidos), o (c) una porción de una región bisagra natural que comprende la región bisagra central (que puede ser 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, o al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en longitud). Uno o más residuos de cisteína en una región bisagra de inmunoglobulina natural pueden estar sustituidos por uno o más otros residuos de aminoácidos (por ejemplo, uno o más residuos de serina). Una región bisagra de inmunoglobulina alterada puede tener alternativa o adicionalmente un residuo de prolina de una región bisagra de inmunoglobulina de tipo salvaje sustituida por otro residuo de aminoácido (por ejemplo, un residuo de serina).

Otros dominios bisagra ilustrativos adecuados para usar en los CAR descritos en este documento incluyen la región bisagra derivada de las regiones extracelulares de proteínas de membrana tipo 1 tales como CD8α, CD4, CD28 y CD7, que pueden ser regiones bisagra de tipo salvaje de estas moléculas o puede ser alterado. El dominio bisagra puede comprender una región bisagra CD8α.

5. Dominio transmembrana (TM)

El "dominio transmembrana" es la porción del CAR que fusiona la porción de unión extracelular y el dominio de señalización intracelular y ancla el CAR a la membrana plasmática de la célula efectora inmune. El dominio TM puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. El dominio TM puede derivarse de (es decir, comprender al menos la(s) región(es) transmembrana de la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154 y PD1. El dominio TM puede ser sintético y comprender predominantemente residuos hidrófobos tales como leucina y valina.

Los CAR contemplados en el presente documento pueden comprender un dominio TM derivado de CD8α. Un CAR contemplado en el presente documento puede comprender un dominio TM derivado de CD8α y un enlazante oligo o polipéptido corto, preferiblemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de longitud que une el TM dominio y el dominio de señalización intracelular de la CAR. Un enlazador basado en glicina-serina proporciona un enlazador particularmente adecuado.

6. Dominio de señalización intracelular

Los CAR contemplados en el presente documento pueden comprender un dominio de señalización intracelular. Un "dominio de señalización intracelular" se refiere a la parte de un CAR que participa en la transducción del mensaje de unión efectiva de CAR BCMA a un polipéptido BCMA humano en el interior de la célula efectora inmune para provocar la función de la célula efectora, por ejemplo, activación, producción de citoquinas, proliferación y actividad citotóxica, incluida la liberación de factores citotóxicos a la célula diana unida a CAR, u otras respuestas celulares provocadas con la unión del antígeno al dominio CAR extracelular.

El término "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula efectora inmune. La función efectora de la célula T, por ejemplo, puede ser actividad citolítica o ayuda o actividad que incluye la secreción de una citoquina. Por lo tanto, el término "dominio de señalización intracelular" se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y que dirige a la célula a realizar una función especializada. Aunque generalmente se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario usar todo el dominio. En la medida en que se use una porción truncada de un dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada se puede usar en lugar del dominio completo siempre que transduzca la señal de función efectora. El término dominio de señalización intracelular pretende incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función efectora.

Se sabe que las señales generadas a través del TCR solo son insuficientes para la activación completa de la célula T y que también se requiere una señal secundaria o coestimuladora. Por lo tanto, se puede decir que la activación de células T está mediada por dos clases distintas de dominios de señalización intracelular: dominios de señalización primarios que inician la activación primaria dependiente de antígeno a través del TCR (por ejemplo, un complejo TCR/CD3) y dominios de señalización coestimuladores que actúan de manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora. Un CAR contemplado en el presente documento puede comprender un dominio de señalización intracelular que comprende uno o más "dominio de señalización coestimuladora" y un "dominio de señalización primario".

Los dominios de señalización primarios regulan la activación primaria del complejo TCR, ya sea de forma estimulante o inhibitoria. Los dominios de señalización primarios que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basados en tirosina inmunorreceptores o ITAM.

Ejemplos ilustrativos de ITAM que contiene dominios de señalización primarios que son de uso particular incluyen los derivados de TCRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En particular, un CAR puede comprender un dominio de señalización primario CD3ζ y uno o más dominios de señalización coestimuladores. Los dominios de señalización primarios intracelular y de señalización coestimuladora pueden estar unidos en cualquier orden en tándem al terminal carboxilo del dominio transmembrana.

Los CAR contemplados en el presente documento comprenden uno o más dominios de señalización coestimuladores para mejorar la eficacia y la expansión de las células T que expresan los receptores CAR. Como se usa en el presente documento, el término "dominio de señalización coestimuladora" o "dominio de coestimulación" se refiere a un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de la superficie celular distintas de los receptores de antígenos o receptores Fc que proporcionan una segunda señal necesaria para la activación y función eficiente de los linfocitos T al unirse al antígeno. Ejemplos ilustrativos de tales moléculas coestimuladoras incluyen CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM y ZAP70. Un CAR puede comprender uno o más dominios de señalización coestimuladores seleccionados del grupo que consiste en CD28, CD137 y CD134, y un dominio de señalización primario CD3ζ.

Un CAR puede comprender dominios de señalización coestimuladores CD28 y CD137 y un dominio de señalización primario CD3ζ.

Un CAR puede comprender dominios de señalización coestimuladores CD28 y CD134 y un dominio de señalización primario CD3ζ.

Un CAR puede comprender dominios de señalización coestimuladores CD137 y CD134 y un dominio de señalización primario CD3ζ.

Los CAR contemplados en el presente documento pueden comprender un anticuerpo anti-BCMA murino o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un polipéptido BCMA expresado en células B.

Un CAR puede comprender un scFv anti-BCMA murino que se une a un polipéptido BCMA; un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154 y PD1; y uno o más dominios de señalización coestimuladores intracelulares de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM y ZAP70; y un dominio de señalización primario de TCRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ, CD22, CD79a, CD79b y CD66d.

Un CAR puede comprender un scFv anti-BCMA murino que se une a un polipéptido BCMA; un dominio bisagra seleccionado del grupo que consiste en: bisagra IgG1/CH2/CH3, bisagra IgG4/CH2/CH3 y una bisagra CD8α; un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154 y PD1; y uno o más dominios de señalización coestimuladores intracelulares de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM y ZAP70; y un dominio de señalización primario de TCRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ, CD22, CD79a, CD79b y CD66d.

Un CAR puede comprender un scFv anti-BCMA murino que se une a un polipéptido BCMA; un dominio bisagra seleccionado del grupo que consiste en: bisagra IgG1/CH2/CH3, bisagra IgG4/CH2/CH3 y una bisagra CD8α; un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154 y PD1; un enlazador oligo o polipéptido corto, preferiblemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de longitud que une el dominio TM al dominio de señalización intracelular del CAR; y uno o más dominios de señalización coestimuladores intracelulares de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM y ZAP70; y un dominio de señalización primario de TCRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ, CD22, CD79a, CD79b y CD66d.

Un CAR puede comprender un scFv anti-BCMA murino que se une a un polipéptido BCMA; un dominio bisagra que comprende un polipéptido de bisagra IgG1/CH2/CH3 y un polipéptido CD8α; un dominio transmembrana de CD8α que comprende un enlazante polipeptídico de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 aminoácidos; un dominio de señalización coestimuladora intracelular CD137; y un dominio de señalización primario CD3ζ.

Un CAR puede comprender un scFv anti-BCMA murino que se une a un polipéptido BCMA; un dominio bisagra que comprende un polipéptido CD8α; un dominio transmembrana de CD8α que comprende un enlazante polipeptídico de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 aminoácidos; un dominio de señalización coestimuladora intracelular CD 134; y un dominio de señalización primario CD3ζ.

Un CAR puede comprender un scFv anti-BCMA murino que se une a un polipéptido BCMA; un dominio bisagra que comprende un polipéptido CD8α; un dominio transmembrana de CD8α que comprende un enlazador polipeptídico de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 aminoácidos; un dominio de señalización coestimuladora intracelular CD28; y un dominio de señalización primario CD3ζ.

Además, el diseño de los CAR contemplados en el presente documento permite una expansión mejorada, persistencia a largo plazo y propiedades citotóxicas tolerables en las células T que expresan los CAR en comparación con las células T no modificadas o las células T modificadas para expresar otros CAR.

D. Polipéptidos

La presente divulgación contempla, en parte, polipéptidos CAR y sus fragmentos, células y composiciones que comprenden los mismos, y vectores que expresan polipéptidos. Se puede proporcionar un polipéptido que comprende uno o más CAR como se establece en SEQ ID NO: 9.

"Polipéptido", "fragmento de polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente, a menos que se especifique lo contrario, y de acuerdo con el significado convencional, es decir, como una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos no están limitados a una longitud específica, por ejemplo, pueden comprender una secuencia de proteína de longitud completa o un fragmento de una proteína de longitud completa, y pueden incluir modificaciones postraducción del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como de origen no natural. Los polipéptidos CAR contemplados en el presente documento pueden comprender una secuencia de señalización (o guía) en el extremo N-terminal de la proteína, que dirige la transferencia de la proteína de forma cotraducción o postraducción. Ejemplos ilustrativos de secuencias señal adecuadas útiles en los CAR descritos aquí incluyen, pero no se limitan a, la secuencia señal de cadena pesada de IgG1 y la secuencia señal de CD8α. Los polipéptidos se pueden preparar usando

cualquiera de una variedad de técnicas recombinantes y/o sintéticas bien conocidas. Los polipéptidos contemplados en el presente documento abarcan específicamente los CAR de la presente divulgación, o secuencias que tienen eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de un CAR como se describe en el presente documento.

Un "péptido aislado" o un "polipéptido aislado" y similares, como se usa en el presente documento, se refieren al aislamiento y/o purificación in vitro de una molécula de péptido o polipéptido de un entorno celular, y de la asociación con otros componentes del celular, es decir, no está significativamente asociado con sustancias in vivo. De manera similar, una "célula aislada" se refiere a una célula que se ha obtenido de un tejido u órgano in vivo y está sustancialmente libre de matriz extracelular.

Los polipéptidos incluyen "variantes de polipéptidos". Las variantes de polipéptido pueden diferir de un polipéptido natural en una o más sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones. Dichas variantes pueden ser de origen natural o pueden generarse sintéticamente, por ejemplo, modificando una o más de las secuencias de polipéptidos anteriores. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de los CAR mediante la introducción de una o más sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones en un dominio de unión, bisagra, dominio TM, dominio de señalización coestimuladora o dominio de señalización primario de un polipéptido CAR. Preferiblemente, los polipéptidos incluyen polipéptidos que tienen al menos aproximadamente 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de aminoácidos con los mismos.

Los polipéptidos incluyen "fragmentos de polipéptidos". Los fragmentos de polipéptidos se refieren a un polipéptido, que puede ser monomérico o multimérico, que tiene una eliminación amino terminal, una eliminación carboxilo terminal y/o una eliminación o sustitución interna de un polipéptido producido de forma natural o recombinante. Un fragmento de polipéptido puede comprender una cadena de aminoácidos de al menos 5 a aproximadamente 500 aminoácidos de longitud. Se apreciará que los fragmentos pueden ser al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 450 aminoácidos de largo. Los fragmentos de polipéptidos particularmente útiles incluyen dominios funcionales, que incluyen dominios de unión a antígeno o fragmentos de anticuerpos. En el caso de un anticuerpo anti-BCMA murino, los fragmentos útiles incluyen, pero no se limitan a: una región CDR, una región CDR3 de la cadena pesada o ligera; una región variable de una cadena pesada o ligera; una porción de una cadena de anticuerpo o región variable que incluye dos CDR; y similares.

El polipéptido también puede fusionarse en el marco o conjugarse con un enlazante u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido (por ejemplo, poli-His), o para mejorar la unión del polipéptido a un soporte sólido.

Como se indicó anteriormente, los polipéptidos pueden alterarse de diversas maneras, incluyendo sustituciones, eliminaciones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. Los métodos para tales manipulaciones son generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, las variantes de secuencia de aminoácidos de un polipéptido de referencia se pueden preparar mediante mutaciones en el ADN. Los métodos para mutagénesis y alteraciones de la secuencia de nucleótidos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kunkel (1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 488-492), Kunkel et al., (1987, Methods in Enzymol, 154: 367-382), patente de los Estados Unidos No. 4,873,192, Watson, J. D. et al., (Molecular Biology of the Gene, cuarta edición, Benjamin/Cummings, Menlo Park, California, 1987) y las referencias citadas allí. En el modelo de Dayhoff et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington D.C.), se puede encontrar orientación sobre las sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan la actividad biológica de la proteína de interés.

Una variante puede contener sustituciones conservadoras. Una "sustitución conservadora" es aquella en donde un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de modo que un experto en la técnica de la química de péptidos esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido no cambien sustancialmente. Se pueden realizar modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y polipéptidos y aún obtener una molécula funcional que codifique un polipéptido variante o derivado con características deseables. Cuando se desea alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido para crear un polipéptido variante equivalente, o incluso mejorado, un experto en la materia, por ejemplo, puede cambiar uno o más de los codones de la secuencia de ADN codificadora, por ejemplo, de acuerdo con la Tabla 1.

Tabla 1- Codones de aminoácidos

| Aminoácidos | Código de una letra | Código de tres letras | Codones | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Alanina | A | Ala | GCA | GCC | GCG | GCU |
| Cisteína | C | Cys | UGC | UGU | | |

| Aminoácidos | Código de una letra | Código de tres letras | Codones | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ácido aspártico | D | Asp | GAC | GAU | | | | |
| Ácido glutámico | E | Glu | GAA | GAG | | | | |
| Fenilalanina | F | Phe | UUC | UUU | | | | |
| Glicina | G | Gly | GGA | GGC | GGG | GGU | | |
| Histidina | H | His | CAC | CAU | | | | |
| Isoleucina | I | Iso | AUA | AUC | AUU | | | |
| Lisina | K | Lys | AAA | AAG | | | | |
| Leucina | L | Leu | UUA | UUG | CUA | CUC | CUG | CUU |
| Metionina | M | Met | AUG | | | | | |
| Asparagina | N | Asn | AAC | AAU | | | | |
| Prolina | P | Pro | CCA | CCC | CCG | CCU | | |
| Glutamina | Q | Gln | CAA | CAG | | | | |
| Arginina | R | Arg | AGA | AGG | CGA | CGC | CGG | CGU |
| Serina | S | Ser | AGC | AGU | UCA | UCC | UCG | UCU |
| Treonina | T | Thr | ACA | ACC | ACG | ACU | | |
| Valina | V | Val | GUA | GUC | GUG | GUU | | |
| Triptófano | W | Trp | UGG | | | | | |
| Tirosina | Y | Tyr | UAC | UAU | | | | |

Se puede encontrar orientación para determinar qué residuos de aminoácidos se pueden sustituir, insertar o eliminar sin abolir la actividad biológica utilizando programas informáticos bien conocidos en la técnica, tales como el software DNASTAR™. Preferiblemente, los cambios de aminoácidos en las variantes de proteínas descritas en el presente documento son cambios conservadores de aminoácidos, es decir, sustituciones de aminoácidos con carga similar o sin carga. Un cambio conservador de aminoácidos implica la sustitución de uno de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos de origen natural generalmente se dividen en cuatro familias: ácidos (aspartato, glutamato), básicos (lisina, arginina, histidina), no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) y sin carga aminoácidos polares (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos. En un péptido o proteína, los expertos en esta técnica conocen sustituciones conservadoras adecuadas de aminoácidos y generalmente pueden realizarse sin alterar la actividad biológica de una molécula resultante. Los expertos en esta técnica reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácidos individuales en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson et al. Molecular Biology of the Gene, cuarta edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p.224). Las sustituciones conservadoras de ejemplo se describen en la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. 61/241,647.

En la realización de tales cambios, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice de aminoácidos hidropáticos para conferir una función biológica interactiva a una proteína se entiende generalmente en la técnica (Kyte and Doolittle, 1982). A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático en función de sus características de hidrofobicidad y carga (Kyte and Doolittle, 1982). Estos valores son: isoleucina (+4.5); valina (+4.2); leucina (+3.8); fenilalanina (+2.8); cisteína/cisteína (+2.5); metionina (+1.9); alanina (+1.8); glicina (-0.4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1.3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3.5); aspartato (-3.5); asparagina (-3.5); lisina (-3,9); y arginina (-4.5).

Se sabe en la técnica que ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos que tienen un índice o puntaje hidropático similar y todavía dan como resultado una proteína con actividad biológica similar, es decir, todavía obtienen una proteína biológica funcionalmente equivalente. Al realizar tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ±2, aquellos dentro de ±1 son particularmente preferidos, y aquellos dentro de ±0.5 son aún más particularmente preferidos. También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse eficazmente en base a la hidrofilicidad.

Como se detalla en la Patente de Estados Unidos No. 4,554,101, los siguientes valores de hidrofilicidad se han asignado a residuos de aminoácidos: arginina (+3.0); lisina (+3.0); aspartato (+3.0 ± 1); glutamato (+3.0 ± 1); serina (+0.3); asparagina (+0.2); glutamina (+0.2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0.5 ± 1); alanina (-0.5); histidina (-0.5); cisteína (-1.0); metionina (-1,3); valina (-1.5); leucina (-1.8); isoleucina (-1.8); tirosina (-2.3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3.4). Se entiende que un aminoácido puede ser sustituido por otro que tenga un valor de hidrofilicidad similar y aún así obtener una proteína biológicamente equivalente y, en particular, una proteína inmunológicamente equivalente. En tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilicidad están dentro de ±2, aquellos dentro de ±1 son particularmente preferidos, y aquellos dentro de ±0.5 son aún más particularmente preferidos.

Como se describió anteriormente, las sustituciones de aminoácidos pueden basarse en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofilicidad, carga, tamaño y similares.

Las variantes de polipéptidos incluyen además formas glucosiladas, conjugados agregativos con otras moléculas y conjugados covalentes con restos químicos no relacionados (por ejemplo, moléculas pegiladas). Las variantes covalentes pueden prepararse uniendo funcionalidades a grupos que se encuentran en la cadena de aminoácidos o en el residuo N o C terminal, como se conoce en la técnica. Las variantes también incluyen variantes alélicas, variantes de especies y muteínas. Los truncamientos o eliminaciones de regiones que no afectan la actividad funcional de las proteínas también son variantes.

Cuando se desea la expresión de dos o más polipéptidos, las secuencias de polinucleótidos que los codifican pueden separarse mediante una secuencia IRES como se describe en otra parte de este documento. Dos o más polipéptidos pueden expresarse como una proteína de fusión que comprende una o más secuencias de polipéptidos autoescindibles.

Los polipéptidos incluyen polipéptidos de fusión. Se pueden proporcionar polipéptidos de fusión y polinucleótidos que codifican polipéptidos de fusión, por ejemplo, CAR. Los polipéptidos de fusión y las proteínas de fusión se refieren a un polipéptido que tiene al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez o más segmentos de polipéptidos. Los polipéptidos de fusión están típicamente unidos al C-terminal del N-terminal, aunque también pueden estar unidos del C-terminal al C-terminal, del N-terminal al N-terminal o del N-terminal al C-terminal. Los polipéptidos de la proteína de fusión pueden estar en cualquier orden o en un orden específico. Los polipéptidos de fusión o las proteínas de fusión también pueden incluir variantes modificadas conservativamente, variantes polimórficas, alelos, mutantes, subsecuencias y homólogos entre especies, siempre que se mantenga la actividad transcripcional deseada del polipéptido de fusión. Los polipéptidos de fusión se pueden producir por métodos químicos sintéticos o por enlace químico entre los dos restos o generalmente se pueden preparar usando otras técnicas estándar. Las secuencias de ADN ligadas que comprenden el polipéptido de fusión están unidas operativamente a elementos de control transcripcionales o por transcripciones adecuados como se discute en otra parte del presente documento.

Un asociado de fusión puede comprender una secuencia que ayuda a expresar la proteína (un potenciador de la expresión) con rendimientos más altos que la proteína recombinante nativa. Se pueden seleccionar otros asociados de fusión para aumentar la solubilidad de la proteína o para permitir que la proteína se dirija a los compartimentos intracelulares deseados o para facilitar el transporte de la proteína de fusión a través de la membrana celular.

Los polipéptidos de fusión pueden comprender además una señal de escisión de polipéptidos entre cada uno de los dominios de polipéptidos descritos en el presente documento. Además, el sitio del polipéptido se puede poner en cualquier secuencia peptídica enlazadora. Ejemplos de señales de escisión de polipéptidos incluyen sitios de reconocimiento de escisión de polipéptidos tales como sitios de escisión de proteasas, sitios de escisión de nucleasas (por ejemplo, sitios de reconocimiento de enzimas de restricción raros, sitios de reconocimiento de ribozimas de autoescisión) y oligopéptidos virales de autoescisión (véase deFelipe and Ryan, 2004. Traffic, 5(8); 616-26).

Los expertos en la técnica conocen sitios de escisión de proteasa adecuados y péptidos de autoescisión (véase, por ejemplo, en Ryan et al., 1997. J. Gener. Virol. 78, 699-722; Scymczak et al. (2004) Nature Biotech.5, 589-594). Los sitios de escisión de proteasa de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los sitios de escisión de proteasas de potivirus NIa (por ejemplo, Proteasa de virus de corrosión del tabaco), proteasas de potivirus HC, proteasas de potivirus P1 (P35), proteasas de byovirus NIa, proteasas codificadas por ARN de byovirus, proteasas de aftovirus L, proteasas de enterovirus 2A, proteasas de rinovirus 2A, proteasas de picorna 3C, proteasas de comovirus 24K, proteasas de nepovirus 24K, RTSV (virus esférico de tungro de arroz) proteasa similar a 3C, PYVF (virus de la mancha amarilla de la pastinaca), proteasa similar a 3C, heparina trombina, factor Xa y enteroquinasa. Debido a su alta rigurosidad de escisión, se prefieren los sitios de escisión de proteasa TEV (virus de ataque químico del tabaco) en una realización, por ejemplo, EXXYXQ (G/S) (SEQ ID NO: 23), por ejemplo, ENLYFQG (SEQ ID NO: 24) y ENLYFQS (SEQ ID NO: 25), en donde X representa cualquier aminoácido (la escisión por TEV ocurre entre Q y G o Q y S).

Los péptidos autoescindibles pueden incluir aquellas secuencias de polipéptidos obtenidas a partir de péptidos potivirus y cardiovirus 2A, FMDV (virus de la fiebre aftosa), virus de la rinitis equina A, virus Thata asigna y teschovirus porcino.

El sitio del polipéptido de autoescisión puede comprender un sitio, secuencia o dominio de tipo 2A o 2A (Donnelly et al., 2001. J. Gen. Virol. 82: 1027-1041).TABLA 2: Los sitios 2A de ejemplo incluyen las siguientes secuencias:

| | |
|---|---|
| SEQ ID NO: 26 | LLNFDLLKLAGDVESNPGP |
| SEQ ID NO: 27 | TLNFDLLKLAGDVESNPGP |
| SEQ ID NO: 28 | LLKLAGDVESNPGP |
| SEQ ID NO: 29 | NFDLLKLAGDVESNPGP |
| SEQ ID NO: 30 | QLLNFDLLKLAGDVESNPGP |
| SEQ ID NO: 31 | APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP |
| SEQ ID NO: 32 | VTELLYRMKRAETYCPRPLLAIHPTEARHKQKIVAPVKQT |
| SEQ ID NO: 33 | LNFDLLKLAGDVESNPGP |
| SEQ ID NO: 34 | LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP |
| SEQ ID NO: 35 | EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP |

Un polipéptido contemplado en el presente documento puede comprender un polipéptido CAR.

E. Polinucleótidos

Se puede proporcionar un polinucleótido que codifica uno o más polipéptidos CAR, por ejemplo, SEQ ID NO: 10. Como se usa en el presente documento, los términos "polinucleótido" o "ácido nucleico" se refieren a ARN mensajero (ARNm), ARN, ARN genómico (ARNg), más ARN de cadena (ARN(+)), ARN de cadena menos (ARN(-)), ADN genómico (ADNg), ADN complementario (ADNc) o ADN recombinante. Los polinucleótidos incluyen polinucleótidos monocatenarios y bicatenarios. Preferiblemente, los polinucleótidos incluyen polinucleótidos o variantes que tienen al menos aproximadamente 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de referencia descritas en este documento (véase, por ejemplo, Listado de secuencias), típicamente donde la variante mantiene al menos una actividad biológica de la secuencia de referencia. Se contemplan polinucleótidos que comprenden vectores de expresión, vectores virales y plásmidos de transferencia, y composiciones, y células que comprenden los mismos.

Se pueden proporcionar polinucleótidos que codifican al menos aproximadamente 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 1000, 1250, 1500, 1750 o 2000 o más residuos de aminoácidos contiguos de un polipéptido, así como todas las longitudes intermedias. Se entenderá fácilmente que "longitudes intermedias", en este contexto, significa cualquier longitud entre los valores citados, tales como 6, 7, 8, 9, etc., 101, 102, 103, etc. 151, 152, 153, etc. 201, 202, 203, etc.

Como se usa en este documento, los términos "variante polinucleotídica" y "variante" y similares se refieren a polinucleótidos que muestran una identidad de secuencia sustancial con una secuencia polinucleotídica de referencia o polinucleótidos que se hibridan con una secuencia de referencia en condiciones rigurosas que se definen a continuación. Estos términos incluyen polinucleótidos en los que se han agregado o eliminado uno o más nucleótidos, o se han reemplazado con diferentes nucleótidos en comparación con un polinucleótido de referencia. A este respecto, se entiende bien en la técnica que ciertas alteraciones que incluyen mutaciones, adiciones, eliminaciones y sustituciones pueden hacerse a un polinucleótido de referencia por lo que el polinucleótido alterado retiene la función o actividad biológica del polinucleótido de referencia.

Las citaciones "identidad de secuencia" o, por ejemplo, que comprenden una "secuencia 50% idéntica a", como se usa en el presente documento, se refieren al grado en que las secuencias son idénticas en una base de nucleótido por nucleótido o aminoácido por aminoácido en una ventana de comparación. Por lo tanto, se puede calcular un "porcentaje de identidad de secuencia" comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, I) o el residuo de aminoácido idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) ocurre en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Se incluyen nucleótidos y polipéptidos que tienen al menos aproximadamente 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de referencia descritas aquí, típicamente donde la variante de polipéptido mantiene al menos una actividad biológica del polipéptido de referencia.

Los términos utilizados para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" tiene una longitud de al menos 12 pero con frecuencia de 15 a 18 y, a menudo, de al menos 25 unidades de monómero, incluidos nucleótidos y residuos de aminoácidos. Debido a que dos polinucleótidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (es decir, solo una porción de la secuencia completa de polinucleótidos) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) los polinucleótidos se realizan típicamente comparando secuencias de los dos polinucleótidos sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, generalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 100, más generalmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en donde se compara una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de las dos secuencias están alineadas de manera óptima. La ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) de aproximadamente 20% o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación puede llevarse a cabo mediante implementaciones computarizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, Estados Unidos) o por inspección y la mejor alineación (es decir, que resulta en el mayor porcentaje de homología en la ventana de comparación) generada por cualquiera de los diversos métodos seleccionados. También se puede hacer referencia a la familia de programas BLAST como se describe por ejemplo por Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res. 25: 3389. Se puede encontrar una discusión detallada del análisis de secuencia en la Unidad 19.3 de Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Capítulo 15.

Como se usa en el presente documento, "polinucleótido aislado" se refiere a un polinucleótido que se ha purificado a partir de las secuencias que lo flanquean en un estado natural, por ejemplo, un fragmento de ADN que se ha eliminado de las secuencias que normalmente son adyacentes a un fragmento. Un "polinucleótido aislado" también se refiere a un ADN complementario (ADNc), un ADN recombinante u otro polinucleótido que no existe en la naturaleza y que ha sido hecho por la mano del hombre.

Los términos que describen la orientación de los polinucleótidos incluyen: 5' (normalmente el extremo del polinucleótido que tiene un grupo fosfato libre) y 3' (normalmente el extremo del polinucleótido que tiene un grupo hidroxilo (OH) libre). Las secuencias de polinucleótidos se pueden anotar en la orientación 5' a 3' o en la orientación 3' a 5'. Para el ADN y el ARNm, la cadena 5' a 3' se designa como la cadena "sentido", "más" o "codificante" porque su secuencia es idéntica a la secuencia del mensaje previo (premARN) [excepto para el uracilo (U) en ARN, en lugar de timina (T) en el ADN]. Para el ADN y el ARNm, la cadena complementaria 3' a 5' que es la cadena transcrita por la ARN polimerasa se designa como cadena "plantilla", "antisentido", "menos" o "no codificante". Como se usa en el presente documento, el término "orientación inversa" se refiere a una secuencia de 5' a 3' escrita en la orientación de 3' a 5' o una secuencia de 3' a 5' escrita en la orientación de 5' a 3'.

Los términos "complementario" y "complementariedad" se refieren a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las reglas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, la cadena complementaria de la secuencia de ADN 5' A G T C A T G 3' es 3' T C A G T A C 5'. La última secuencia a menudo se escribe como el complemento inverso con el extremo 5' a la izquierda y el extremo 3' a la derecha, 5'C A T G A C T 3'. Se dice que

una secuencia que es igual a su complemento inverso es una secuencia palindrómica. La complementariedad puede ser "parcial", en donde solo algunas de las bases de los ácidos nucleicos coinciden de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases. O puede haber complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos.

Además, los expertos en la materia apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido, o fragmento de variante del mismo, como se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos tienen una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, los polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codones se contemplan específicamente, por ejemplo, polinucleótidos que están optimizados para la selección de codones humanos y/o primates. Además, también se pueden usar alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos proporcionados en el presente documento. Los alelos son genes endógenos que se alteran como resultado de una o más mutaciones, como eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos.

El término "casete de ácido nucleico" como se usa en el presente documento se refiere a secuencias genéticas dentro de un vector que puede expresar un ARN, y posteriormente una proteína. El casete de ácido nucleico contiene el gen de interés, por ejemplo, un CAR. El casete de ácido nucleico está orientado de forma secuencial y posicional dentro del vector de modo que el ácido nucleico en el casete pueda transcribirse en ARN y, cuando sea necesario, traducirse en una proteína o un polipéptido, sufrir modificaciones postraducción apropiadas requeridas para la actividad en la célula transformada, y translocarse al compartimento apropiado para la actividad biológica dirigiéndose a compartimentos intracelulares apropiados o secreción en compartimentos extracelulares. Preferiblemente, el casete tiene sus extremos 3' y 5' adaptados para una fácil inserción en un vector, por ejemplo, tiene sitios de endonucleasa de restricción en cada extremo. Preferiblemente, el casete de ácido nucleico contiene la secuencia de un receptor de antígeno quimérico usado para tratar una neoplasia maligna de células B. El casete se puede quitar e insertar en un plásmido o vector viral como una sola unidad.

En particular, los polinucleótidos incluyen al menos un polinucleótido de interés. Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido de interés" se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido (es decir, un polipéptido de interés), insertado en un vector de expresión que se desea expresar. Un vector puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 polinucleótidos de interés. El polinucleótido de interés puede codificar un polipéptido que proporciona un efecto terapéutico en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno. Los polinucleótidos de interés, y los polipéptidos codificados a partir de los mismos, incluyen polinucleótidos que codifican polipéptidos de tipo salvaje, así como variantes funcionales y fragmentos de los mismos. En realizaciones particulares, una variante funcional tiene al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 99% de identidad con un polinucleótido o secuencia de polipéptidos de referencia de tipo salvaje correspondiente. Una variante o fragmento funcional puede tener al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% de una actividad biológica de un polipéptido de tipo salvaje correspondiente.

El polinucleótido de interés puede no codificar un polipéptido, pero sirve como plantilla para transcribir ARNmi, ARNsi o ARNsh, ribozima u otro ARN inhibidor. Un polinucleótido puede comprender un polinucleótido de interés que codifica un CAR y uno o más polinucleótidos de interés adicionales que incluyen, pero no se limitan a, una secuencia inhibidora de ácido nucleico que incluye, pero no se limita a: un ARNsi, un ARNmi, un ARNsh y una ribozima.

Como se usa en el presente documento, los términos "ARNip" o "ARN interferente corto" se refieren a una secuencia polinucleotídica corta que media en un proceso de silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia, inhibición por transcripción, inhibición transcripcional o ARNi epigenético en animales (Zamore et al., 2000, Cell, 101, 25-33; Fire et al., 1998, Nature, 391, 806; Hamilton et al., 1999, Science, 286, 950-951; Lin et al., 1999, Nature, 402, 128-129; Sharp, 1999, Genes & Dev., 13, 139-141; y Strauss, 1999, Science, 286, 886). Un ARNip puede comprender una primera cadena y una segunda cadena que tienen el mismo número de nucleósidos; sin embargo, la primera y la segunda cadena están desplazadas de tal manera que los dos nucleósidos terminales en la primera y segunda cadena no están emparejados con un residuo en la cadena complementaria. En ciertos casos, los dos nucleósidos que no están emparejados son los residuos de timidina. El ARNsi debe incluir una región de homología suficiente con el gen diana, y tener una longitud suficiente en términos de nucleótidos, de modo que el ARNsi, o un fragmento del mismo, pueda mediar la regulación descendente del gen diana. Por lo tanto, un ARNip incluye una región que es al menos parcialmente complementaria al ARN diana. No es necesario que haya una complementariedad perfecta entre el ARNsi y la diana, pero la correspondencia debe ser suficiente para permitir que el ARNsi, o un producto de escisión del mismo, dirija el silenciamiento específico de la secuencia, como por la escisión de lARN del ARN diana. La complementariedad, o grado de homología con la cadena objetivo, es más crítica en la cadena antisentido. Si bien a menudo se desea una complementariedad perfecta, particularmente en la cadena antisentido, algunas realizaciones incluyen una o más, pero preferiblemente 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 o menos desajustes con respecto al ARN diana. Los desajustes son más tolerados en las regiones terminales, y si están presentes están preferiblemente en una región o regiones terminales, por ejemplo, dentro de 6, 5, 4 o 3 nucleótidos del extremo 5' y/o 3'. La cadena sentido solo necesita ser suficientemente complementaria con la cadena antisentido para mantener el carácter global de doble cadena de la molécula.

Además, un ARNip puede modificarse o incluir análogos de nucleósidos. Las regiones monocatenarias de un ARNip pueden modificarse o incluir análogos de nucleósidos, por ejemplo, la región o regiones no emparejadas de una estructura de horquilla, por ejemplo, una región que une dos regiones complementarias, puede tener modificaciones

o análogos de nucleósidos. La modificación para estabilizar uno o más terminales 3' o 5' de un ARNsi, por ejemplo, contra exonucleasas, o para favorecer que el agente de ARNsi antisentido entre en RISC también es útil. Las modificaciones pueden incluir enlazadores amino C3 (o C6, C7, C12), enlazadores de tiol, enlazadores de carboxilo, espaciadores no nucleotídicos (C3, C6, C9, C12, abásico, trietilenglicol, hexaetilenglicol), biotina especial o reactivos de fluoresceína que vienen como fosforamiditas y que tienen otro grupo hidroxilo protegido por DMT, lo que permite múltiples acoplamientos durante la síntesis de ARN. Cada cadena de un ARNip puede tener una longitud igual o inferior a 30, 25, 24, 23, 22, 21 o 20 nucleótidos. La cadena tiene preferiblemente al menos 19 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada cadena puede tener entre 21 y 25 nucleótidos de longitud. Los ARNip preferidos tienen una región dúplex de 17, 18, 19, 29, 21, 22, 23, 24 o 25 pares de nucleótidos, y uno o más envolturas alientes de 2-3 nucleótidos, preferiblemente una o dos envoltura salientes de 3', de 2- 3 nucleótidos.

Como se usa en el presente documento, los términos "miARN" o "microARN" se refieren a pequeños ARN no codificantes de 20-22 nucleótidos, típicamente escindidos de estructuras precursoras de ARN plegadas de ~70 nucleótidos conocidas como pre-miARN. Los miARN regulan negativamente sus objetivos de una de dos maneras, dependiendo del grado de complementariedad entre el miARN y el objetivo. Primero, los miARN que se unen con complementariedad perfecta o casi perfecta a las secuencias de ARNm que codifican proteínas inducen la vía de interferencia mediada por ARN (ARNi). Los miARN que ejercen sus efectos reguladores al unirse a sitios complementarios imperfectos dentro de las regiones 3' no traducidas (UTR) de sus objetivos de ARNm, reprimen la expresión del gen objetivo después de la transcripción, aparentemente a nivel de traducción, a través de un complejo RISC que es similar a, o posiblemente idéntico al que se usa para la ruta de ARNi. De acuerdo con el control por transcripción, los miARN que usan este mecanismo reducen los niveles de proteína de sus genes objetivo, pero los niveles de ARNm de estos genes solo se ven mínimamente afectados. Los miARN abarcan tanto los miARN naturales como los miARN diseñados artificialmente que pueden dirigirse específicamente a cualquier secuencia de ARNm. Por ejemplo, el experto en la técnica puede diseñar construcciones de ARN de horquilla cortas expresadas como transcripciones primarias de miARN humano (por ejemplo, miR-30 o miR-21). Este diseño agrega un sitio de procesamiento de Drosha a la construcción de horquilla y se ha demostrado que aumenta en gran medida la eficiencia de derribo (Pusch et al., 2004). El tallo de la horquilla consiste en 22 nt de dsRNA (por ejemplo, el antisentido tiene una complementariedad perfecta con el objetivo deseado) y un bucle de 15-19 nt de un miR humano. Agregar las secuencias flanqueantes de miR bucle y miR30 en uno o ambos lados de la horquilla da como resultado un aumento de más de 10 veces en el procesamiento de Drosha y Dicer de las horquillas expresadas en comparación con los diseños de ARNsh convencionales sin microARN. El mayor procesamiento de Drosha y Dicer se traduce en una mayor producción de ARNip/miARN y una mayor potencia para las horquillas expresadas.

Como se usa en el presente documento, los términos "ARNsh" o "ARN de horquilla corta" se refieren a la estructura de doble cadena que está formada por una única cadena de ARN autocomplementario. Las construcciones de shARN que contienen una secuencia de nucleótidos idéntica a una porción, de secuencia codificante o no codificante, del gen diana se prefieren para la inhibición. También se ha encontrado que las secuencias de ARN con inserciones, eliminaciones y mutaciones de un solo punto en relación con la secuencia diana son eficaces para la inhibición. Se prefiere una identidad de secuencia superior al 90%, o incluso una identidad de secuencia del 100%, entre el ARN inhibidor y la porción del gen diana. La longitud de la porción de formación de dúplex de un ARNsh puede ser de al menos 20, 21 o 22 nucleótidos de longitud, por ejemplo, correspondiente en tamaño a los productos de ARN producidos por la escisión dependiente de Dicer. La construcción de ARNsh puede tener al menos 25, 50, 100, 200, 300 o 400 bases de longitud. La construcción de ARNsh puede tener una longitud de 400-800 bases. Las construcciones de ARNsh son altamente tolerantes a la variación en la secuencia del bucle y el tamaño del bucle.

Como se usa en el presente documento, el término "ribozima" se refiere a una molécula de ARN catalíticamente activa capaz de escisión específica de sitio de ARNm diana. Se han descrito varios subtipos, por ejemplo, ribozimas de cabeza de martillo y horquilla. La actividad catalítica y la estabilidad de la ribozima pueden mejorarse sustituyendo los ribonucleótidos por desoxirribonucleótidos en bases no catalíticas. Mientras que las ribozimas que escinden el ARNm en secuencias de reconocimiento específicas del sitio pueden usarse para destruir ARNm particulares, se prefiere el uso de ribozimas de cabeza de martillo. Las ribozimas de cabeza de martillo escinden los ARNm en ubicaciones dictadas por regiones flanqueantes que forman pares de bases complementarias con el ARNm objetivo. El único requisito es que el ARNm objetivo tenga la siguiente secuencia de dos bases: 5'-UG-3'. La construcción y producción de ribozimas de cabeza de martillo es bien conocida en la técnica.

Un método preferido de suministro de un polinucleótido de interés que comprende un ARNip, un miARN, un shARN o una ribozima comprende una o más secuencias reguladoras, tales como, por ejemplo, una pol III constitutiva fuerte, por ejemplo, el promotor de ARN ARNsn U6 humano, el promotor de ARNn ARNsn U6 de ratón, el promotor de ARN HI humano y de ratón y el promotor de ARNt-val humano, o un promotor pol II constitutivo fuerte, como se describe en este documento.

Los polinucleótidos, independientemente de la longitud de la secuencia codificante en sí, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, tales como promotores y/o potenciadores, regiones no traducidas (UTR), secuencias señal, secuencias Kozak, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiple, sitios de entrada ribosómica interna (IRES), sitios de reconocimiento de recombinasas (por ejemplo, sitios LoxP, FRT y Att), codones de terminación, señales de terminación transcripcional y polinucleótidos que codifican polipéptidos de autoescisión, etiquetas de epítopo, como se describe en otra parte o como se conoce en la técnica, de modo que su

longitud total puede variar considerablemente. Por lo tanto, se contempla que se pueda emplear un fragmento de polinucleótido de casi cualquier longitud, estando la longitud total preferiblemente limitada por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante pretendido.

Los polinucleótidos pueden prepararse, manipularse y/o expresarse usando cualquiera de una variedad de técnicas bien establecidas conocidas y disponibles en la técnica. Para expresar un polipéptido deseado, se puede insertar una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en el vector apropiado. Ejemplos de vectores son plásmidos, secuencias de replicación autónoma y elementos transponibles. Los vectores de ejemplo adicionales incluyen, sin limitación, plásmidos, fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales como el cromosoma artificial de levadura (YAC), el cromosoma artificial bacteriano (BAC) o el cromosoma artificial derivado de P1 (PAC), bacteriófagos como el fago lambda o el fago M13 y virus animales. Ejemplos de categorías de virus animales útiles como vectores incluyen, sin limitación, retrovirus (incluido lentivirus), adenovirus, virus adenoasociado, herpesvirus (por ejemplo, virus del herpes simple), virus de la viruela, baculovirus, virus del papiloma y papovavirus (por ejemplo, SV40). Ejemplos de vectores de expresión son los vectores pClneo (Promega) para la expresión en células de mamíferos; pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ y pLenti6.2N5-GW/lacZ (Invitrogen) para la transferencia y expresión génica mediada por lentivirus en células de mamíferos. Las secuencias codificantes de las proteínas quiméricas descritas en el presente documento pueden ligarse en tales vectores de expresión para la expresión de la proteína quimérica en células de mamífero.

Un vector que codifica un CAR contemplado en el presente documento puede comprender la secuencia de polinucleótidos establecida en SEQ ID NO: 36.

El vector puede ser un vector episomal o un vector que se mantiene extracromosómicamente. Como se usa en el presente documento, el término "episomal" se refiere a un vector que puede replicarse sin integración en el ADN cromosómico del huésped y sin pérdida gradual de una célula huésped en división, lo que también significa que dicho vector se replica extracromosómicamente o episomalmente. El vector está diseñado para albergar la secuencia que codifica el origen de la replicación del ADN u "ori" de un virus del herpes linfotrófico o un virus del herpes gamma, un adenovirus, SV40, un virus del papiloma bovino o una levadura, específicamente un origen de replicación de un linfotrófico virus del herpes o un virus del herpes gamma correspondiente al oriP del EBV. En un aspecto particular, el virus del herpes linfotrófico puede ser el virus de Epstein Barr (EBV), el virus del herpes del sarcoma de Kaposi (KSHV), el virus del herpes saimiri (HS) o el virus de la enfermedad de Marek (MDV). El virus Epstein Barr (EBV) y el virus del herpes sarcoma de Kaposi (KSHV) también son ejemplos de un virus herpes gamma. Típicamente, la célula huésped comprende la proteína transactivadora de replicación viral que activa la replicación.

Los "elementos de control" o "secuencias reguladoras" presentes en un vector de expresión son aquellas regiones no traducidas del vector de origen de replicación, casetes de selección, promotores, potenciadores, señales de inicio de traducción (secuencia Shine Dalgarno o secuencia Kozak) intrones, una secuencia de poliadenilación, regiones no traducidas 5' y 3', que interactúan con las proteínas celulares del huésped para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Dichos elementos pueden variar en su fuerza y especificidad. Dependiendo del sistema de vectores y del huésped utilizado, se puede usar cualquier número de elementos de transcripción y traducción adecuados, incluidos promotores ubicuos y promotores inducibles.

Un vector para usar en la práctica de la presente divulgación que incluye, pero no se limita a vectores de expresión y vectores virales, incluirá secuencias de control exógenas, endógenas o heterólogas tales como promotores y/o potenciadores. Una secuencia de control "endógena" es aquella que está naturalmente ligada a un gen dado en el genoma. Una secuencia de control "exógena" es aquella que se coloca en yuxtaposición a un gen mediante manipulación genética (es decir, técnicas de biología molecular) de tal manera que la transcripción de ese gen es dirigida por el potenciador/promotor vinculado. Una secuencia de control "heteróloga" es una secuencia exógena que es de una especie diferente a la célula que está siendo manipulada genéticamente.

El término "promotor" como se usa en el presente documento se refiere a un sitio de reconocimiento de un polinucleótido (ADN o ARN) al que se une una ARN polimerasa. Una ARN polimerasa inicia y transcribe polinucleótidos unidos operativamente al promotor. Los promotores que operan en células de mamífero pueden comprender una región rica en AT ubicada aproximadamente de 25 a 30 bases aguas arriba del sitio donde se inicia la transcripción y/u otra secuencia encontrada 70 a 80 bases aguas arriba desde el inicio de la transcripción, una región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido.

El término "potenciador" se refiere a un segmento de ADN que contiene secuencias capaces de proporcionar una transcripción mejorada y en algunos casos puede funcionar independientemente de su orientación con respecto a otra secuencia de control. Un potenciador puede funcionar de forma cooperativa o aditiva con promotores y/u otros elementos potenciadores. El término "promotor/potenciador" se refiere a un segmento de ADN que contiene secuencias capaces de proporcionar funciones tanto de promotor como potenciador.

El término "operativamente unido" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. El término puede referirse a un enlace funcional entre una secuencia de control de expresión de ácido nucleico (tal como un promotor y/o potenciador) y una segunda secuencia

de polinucleótidos, por ejemplo, un polinucleótido de interés, en donde la secuencia de control de expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

Como se usa en el presente documento, el término "secuencia de control de la expresión constitutiva" se refiere a un promotor, potenciador o promotor/potenciador que permite continua o continuamente la transcripción de una secuencia unida operativamente. Una secuencia de control de la expresión constitutiva puede ser un promotor, potenciador o promotor/potenciador "ubicuo" que permite la expresión en una amplia variedad de tipos de células y tejidos o un "específico para la célula", "específico para un tipo de célula", "específico para un linaje celular" o promotor, potenciador o promotor/potenciador "específico para tejido" que permita la expresión en una variedad restringida de tipos de células y tejidos, respectivamente.

Las secuencias de control de expresión ubicuas ilustrativas adecuadas para su uso incluyen, pero no se limitan a, un promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), un virus simio viral 40 (SV40) (por ejemplo, temprano o tarde), un virus de leucemia murina de Moloney (MoMLV) LTR promotor, un virus del sarcoma de Rous (RSV) LTR, un promotor del virus del herpes simple (HSV) (timidina quinasa), promotores H5, P7.5 y P11 del virus vaccinia, un promotor del factor de alargamiento 1-alfa (EF1a), respuesta de crecimiento temprano 1 (EGR1), ferritina H (FerH), ferritina L (FerL), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), factor de iniciación de la traducción eucariota 4A1 (EIF4A1), choque térmico 70kDa proteína 5 (HSPA5), choque térmico proteína 90kDa beta, miembro 1 (HSP90B1), proteína de choque térmico 70kDa (HSP70), β-kinesina (β-KIN), el locus ROSA 26 humano (Irions et al., Nature Biotechnology 25, 1477-1482 (2007)), un promotor de Ubiquitina C (UBC), un promotor de fosfoglicerato quinasa 1 (PGK), un potenciador de citomegalovirus/promotor de β-actina de pollo (CAG), una β-actina promotor y un potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo, región de control negativo eliminada, promotor del sitio de unión a cebador dl587rev sustituido (MND) (Challita et al., J Virol. 69(2): 748-55 (1995)).

Un vector puede comprender un promotor MND.

Un vector puede comprender un promotor EFla que comprende el primer intrón del gen EF1a humano.

Un vector puede comprender un promotor EFla que carece del primer intrón del gen EF1a humano.

Puede ser deseable expresar un polinucleótido que comprende un CAR a partir de un promotor específico de células T.

Como se usa en el presente documento, "expresión condicional" puede referirse a cualquier tipo de expresión condicional que incluye, pero no se limita a, expresión inducible; expresión reprimible; expresión en células o tejidos que tienen un estado fisiológico, biológico o de enfermedad particular, etc. Esta definición no pretende excluir el tipo de célula o la expresión específica de tejido. Se proporciona la expresión condicional de un polinucleótido de interés, por ejemplo, la expresión se controla sometiendo una célula, tejido, organismo, etc., a un tratamiento o afección que hace que se exprese el polinucleótido o que provoque un aumento o disminución de la expresión del polinucleótido codificado por el polinucleótido de interés.

Ejemplos ilustrativos de promotores/sistemas inducibles incluyen, pero no se limitan a, promotores inducibles con esteroides tales como promotores para genes que codifican receptores de glucocorticoides o estrógenos (inducibles por tratamiento con la hormona correspondiente), promotor de metalotionina (inducible por tratamiento con diversos metales pesados), promotor MX-1 (inducible por interferón), el sistema regulable de mifepristona "GeneSwitch" (Sirin et al., 2003, Gene, 323: 67), el interruptor de gen inducible cumato (WO 2002/088346), tetraciclina sistemas reguladores dependientes, etc.

La expresión condicional también se puede lograr usando una recombinasa de ADN específica del sitio. El vector puede comprender al menos uno (típicamente dos) sitio(s) para la recombinación mediada por una recombinasa específica del sitio. Como se usa en el presente documento, los términos "recombinasa" o "recombinasa específica del sitio" incluyen proteínas, enzimas, cofactores o proteínas asociadas de escisión o integradoras que están involucradas en reacciones de recombinación que implican uno o más sitios de recombinación (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, siete, diez, doce, quince, veinte, treinta, cincuenta, etc.), que pueden ser proteínas de tipo salvaje (véase Landy, Current Opinion in Biotechnology 3: 699-707 (1993)), o mutantes, derivados (por ejemplo, proteínas de fusión que contienen las secuencias de proteínas de recombinación o fragmentos de las mismas), fragmentos y variantes de las mismas. Ejemplos ilustrativos de recombinasas adecuadas para su uso incluyen, pero no se limitan a: Cre, Int, IHF, Xis, Flp, Fis, Hin, Gin, ΦC31, Cin, Tn3 resolvase, TndX, XerC, XerD, TnpX, Hjc, Gin, SpCCE1 y ParA.

Los vectores pueden comprender uno o más sitios de recombinación para cualquiera de una amplia variedad de recombinasas específicas del sitio. Debe entenderse que el sitio objetivo para una recombinasa específica del sitio es adicional a cualquier sitio requerido para la integración de un vector, por ejemplo, un vector retroviral o un vector lentiviral. Como se usa en el presente documento, los términos "secuencia de recombinación", "sitio de recombinación" o "sitio de recombinación específico del sitio" se refieren a una secuencia de ácido nucleico particular a la que una recombinasa reconoce y se une.

Por ejemplo, un sitio de recombinación para Cre recombinasa es loxP, que es una secuencia de 34 pares de bases que comprende dos repeticiones invertidas de 13 pares de bases (que sirven como sitios de unión a recombinasa)

que flanquean una secuencia central de 8 pares de bases (véase Figura 1 de Sauer, B., Current Opinion in Biotechnology 5: 521-527 (1994)). Otros sitios de ejemplo de loxP incluyen, entre otros: lox511 (Hoess et al., 1996; Bethke and Sauer, 1997), lox5171 (Lee and Saito, 1998), lox2272 (Lee and Saito, 1998), m2 (Langer et al., 2002), lox71 (Albert et al., 1995) y lox66 (Albert et al., 1995).

Los sitios de reconocimiento adecuados para la recombinasa FLP incluyen, pero no se limitan a: FRT (McLeod, et al., 1996), $F_1$, $F_2$, $F_3$ (Schlake y Bode, 1994), $F_4$, $F_5$ (Schlake and Bode, 1994), FRT(LE) (Senecoff et al., 1988), FRT(RE) (Senecoff et al., 1988).

Otros ejemplos de secuencias de reconocimiento son las secuencias attB, attP, attL y attR, que son reconocidas por la enzima recombinasa λ Integrasa, por ejemplo, phi-c31. El ϕC31 SSR media la recombinación solo entre los sitios heterotípicos attB (34 pb de longitud) y attP (39 pb de longitud) (Groth et al., 2000). attB y attP, llamados así por los sitios de unión para la integrasa de fagos en los genomas bacterianos y de fagos, respectivamente, contienen repeticiones invertidas imperfectas que probablemente están unidas por homodímeros ϕC31 (Groth et al., 2000). Los sitios del producto, attL y attR, son efectivamente inertes para una recombinación mediada por ϕC31 adicional (Belteki et al., 2003), haciendo que la reacción sea irreversible. Para catalizar inserciones, se ha encontrado que el ADN que porta attB se inserta en un sitio genómico attP más fácilmente que un sitio attP en un sitio genómico attB (Thyagarajan et al., 2001; Belteki et al., 2003). Por lo tanto, las estrategias típicas se posicionan mediante recombinación homóloga un "sitio de acoplamiento" con soporte de attP en un locus definido, que luego se asocia con una secuencia entrante con soporte de attB para la inserción.

Como se usa en el presente documento, un "sitio de entrada de ribosoma interno" o "IRES" se refiere a un elemento que promueve la entrada directa de ribosoma interno al codón de iniciación, como ATG, de un cistrón (una región codificante de proteína), lo que conduce a la traducción del gen independiente de cubierta. Véase, por ejemplo, Jackson et al., 1990. Trends Biochem Sci 15(12): 477-83) y Jackson and Kaminski. 1995. ARN 1(10): 985-1000. Los vectores pueden incluir uno o más polinucleótidos de interés que codifican uno o más polipéptidos. Para lograr una traducción eficiente de cada uno de la pluralidad de polipéptidos, las secuencias de polinucleótidos pueden estar separadas por una o más secuencias de IRES o secuencias de polinucleótidos que codifican polipéptidos autoescindibles.

Como se usa en el presente documento, el término "secuencia de Kozak" se refiere a una secuencia de nucleótidos corta que facilita en gran medida la unión inicial de ARNm a la pequeña subunidad del ribosoma y aumenta la traducción. La secuencia de consenso de Kozak es (GCC)RCCATGG, donde R es una purina (A o G) (Kozak, 1986. Cell. 44(2): 283-92, y Kozak, 1987. Nucleic Acids Res. 15(20): 8125-48). Los vectores pueden comprender polinucleótidos que tienen una secuencia consenso de Kozak y que codifican un polipéptido deseado, por ejemplo, un CAR.

Un polinucleótido o célula que alberga el polinucleótido puede utilizar un gen suicida, que incluye un gen suicida inducible para reducir el riesgo de toxicidad directa y/o proliferación incontrolada. El gen suicida puede no ser inmunogénico para el huésped que alberga el polinucleótido o la célula. Un cierto ejemplo de un gen suicida que puede usarse es caspasa-9 o caspasa-8 o citosina desaminasa. Caspasa-9 se puede activar usando un inductor químico específico de dimerización (CID).

Los vectores pueden comprender segmentos de genes que hacen que las células efectoras inmunes, por ejemplo, las células T, sean susceptibles de selección negativa in vivo. Por "selección negativa" se entiende que la célula infundida puede eliminarse como resultado de un cambio en la condición in vivo del individuo. El fenotipo seleccionable negativo puede resultar de la inserción de un gen que confiere sensibilidad a un agente administrado, por ejemplo, un compuesto. Los genes seleccionables negativos se conocen en la técnica e incluyen, entre otros, los siguientes: el gen de timidina quinasa del virus del herpes simple tipo I (HSV-I TK) (Wigler et al., Cell 11: 223, 1977) que confiere sensibilidad al ganciclovir; el gen de la hipoxantina fosforibosiltransferasa celular (HPRT), el gen de la adenina fosforibosiltransferasa celular (APRT) y la citosina desaminasa bacteriana (Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992)).

Las células efectoras inmunes modificadas genéticamente, tales como las células T, pueden comprender un polinucleótido que además comprende un marcador positivo que permite la selección de células del fenotipo seleccionable negativo in vitro. El marcador seleccionable positivo puede ser un gen que, al ser introducido en la célula huésped, expresa un fenotipo dominante que permite la selección positiva de células que portan el gen. Los genes de este tipo son conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, el gen de higromicina B fosfotransferasa (hph) que confiere resistencia a la higromicina B, el gen de aminoglicósido fosfotransferasa (neo o aph) de Tn5 que codifica la resistencia al antibiótico G418, el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR), el gen de la adenosina desaminasa (ADA) y el gen de resistencia a múltiples fármacos (MDR).

Preferiblemente, el marcador seleccionable positivo y el elemento seleccionable negativo están unidos de tal manera que la pérdida del elemento seleccionable negativo también necesariamente va acompañada de la pérdida del marcador seleccionable positivo. Incluso más preferiblemente, los marcadores seleccionables positivos y negativos se fusionan de modo que la pérdida de uno de forma obligatoria conduce a la pérdida del otro. Un ejemplo de un polinucleótido fusionado que produce como un producto de expresión un polipéptido que confiere las características

de selección positivas y negativas deseadas descritas anteriormente es un gen de fusión de timidina quinasa de higromicina fosfotransferasa (HyTK). La expresión de este gen produce un polipéptido que confiere resistencia a la higromicina B para la selección positiva in vitro, y sensibilidad al ganciclovir para la selección negativa in vivo. Véase Lupton S. D., et al., Mol. and cell. Biology 1 1: 3374- 3378, 1991. Además, los polinucleótidos que codifican los receptores quiméricos pueden estar en vectores retrovirales que contienen el gen fusionado, particularmente aquellos que confieren resistencia a la higromicina B para la selección positiva in vitro, y sensibilidad al ganciclovir para la selección negativa in vivo, por ejemplo, el vector retroviral HyTK descrito en Lupton, SD et al. (1991), supra. Véanse también las publicaciones de PCT US91/08442 y PCT/US94/05601, de S. D. Lupton, que describen el uso de genes de fusión bifuncionales seleccionables derivados de la fusión de marcadores seleccionables positivos dominantes con marcadores seleccionables negativos.

Los marcadores seleccionables positivos preferidos se derivan de genes seleccionados del grupo que consiste en hph, nco y gpt, y los marcadores seleccionables negativos preferidos se derivan de genes seleccionados del grupo que consiste en citosina desaminasa, HSV-I TK, VZV TK, HPRT, APRT y gpt. Los marcadores especialmente preferidos son genes de fusión bifuncionales seleccionables en los que el marcador seleccionable positivo deriva de hph o neo, y el marcador seleccionable negativo deriva de la citosina desaminasa o un gen TK o marcador seleccionable. Genes suicidas inducibles.

F. Vectores virales

Una célula (por ejemplo, una célula efectora inmune) puede transducirse con un vector retroviral, por ejemplo, un vector lentiviral, que codifica un CAR. Por ejemplo, una célula efectora inmune se transduce con un vector que codifica un CAR que comprende un anticuerpo anti-BCMA murino o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un polipéptido BCMA, con un dominio de señalización intracelular de CD3ζ, CD28, 4-1BB, Ox40, o cualquier combinación de los mismos. Por lo tanto, estas células transducidas pueden provocar una respuesta citotóxica mediada por CAR.

Los retrovirus son una herramienta común para el suministro de genes (Miller, 2000, Nature. 357: 455-460). Se puede usar un retrovirus para administrar un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) a una célula. Como se usa en el presente documento, el término "retrovirus" se refiere a un virus de ARN que transcribe inversamente su ARN genómico en una copia de ADN lineal de doble cadena y posteriormente integra covalentemente su ADN genómico en un genoma del huésped. Una vez que el virus se integra en el genoma del huésped, se lo denomina "provirus". El provirus sirve como plantilla para la ARN polimerasa II y dirige la expresión de las moléculas de ARN que codifican las proteínas estructurales y las enzimas necesarias para producir nuevas partículas virales.

Los retrovirus ilustrativos adecuados para su uso incluyen, pero no se limitan a: virus de la leucemia murina de Moloney (M-MuLV), virus del sarcoma de murino de Moloney (MoMSV), virus del sarcoma de murino Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV), virus de la leucemia del mono gibón (GaLV), virus de la leucemia felina (FLV), virus de la espuma, virus de la leucemia murina Friend, virus de células madre murinas (MSCV) y virus del sarcoma de Rous (RSV) y lentivirus.

Como se usa en este documento, el término "lentivirus" se refiere a un grupo (o género) de retrovirus complejos. Los lentivirus ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: VIH (virus de inmunodeficiencia humana; incluyendo VIH tipo 1 y VIH tipo 2); virus del virus visna-maedi (VMV); el virus de la encefalitis caprina por artritis (CAEV); virus de la anemia infecciosa equina (EIAV); virus de inmunodeficiencia felina (FIV); virus de inmunodeficiencia bovina (BIV); y virus de inmunodeficiencia simia (SIV). En una realización, se prefieren esqueletos de vectores basados en VIH (es decir, elementos de secuencia que actúan en cis del VIH). Se puede usar un lentivirus para administrar un polinucleótido que comprende un CAR a una célula.

Se pueden usar vectores retrovirales y más particularmente vectores lentivirales. Por consiguiente, el término "retrovirus" o "vector retroviral", como se usa en el presente documento, pretende incluir "lentivirus" y "vectores lentivirales" respectivamente.

El término "vector" se usa en el presente documento para referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transferir o transportar otra molécula de ácido nucleico. El ácido nucleico transferido está generalmente unido a, por ejemplo, insertado en la molécula del vector de ácido nucleico. Un vector puede incluir secuencias que dirigen la replicación autónoma en una célula, o puede incluir secuencias suficientes para permitir la integración en el ADN de la célula huésped. Los vectores útiles incluyen, por ejemplo, plásmidos (por ejemplo, plásmidos de ADN o plásmidos de ARN), transposones, cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos y vectores virales. Los vectores virales útiles incluyen, por ejemplo, retrovirus y lentivirus defectuosos en la replicación.

Como será evidente para un experto en la técnica, el término "vector viral" se usa ampliamente para referirse a una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido de transferencia) que incluye elementos de ácido nucleico derivados de virus que típicamente facilitan transferencia de la molécula de ácido nucleico o integración en el genoma de una célula o en una partícula viral que media la transferencia de ácido nucleico. Las partículas virales típicamente incluirán varios componentes virales y, a veces, también componentes de células huésped además de ácido(s) nucleico(s).

El término vector viral puede referirse a un virus o partícula viral capaz de transferir un ácido nucleico a una célula o al ácido nucleico transferido. Los vectores virales y los plásmidos de transferencia contienen elementos genéticos estructurales y/o funcionales que se derivan principalmente de un virus. El término "vector retroviral" se refiere a un vector viral o plásmido que contiene elementos genéticos estructurales y funcionales, o porciones de los mismos, que se derivan principalmente de un retrovirus. El término "vector lentiviral" se refiere a un vector viral o plásmido que contiene elementos genéticos estructurales y funcionales, o porciones de los mismos, incluyendo LTR que se derivan principalmente de un lentivirus. El término "vector híbrido" se refiere a un vector, LTR u otro ácido nucleico que contiene tanto retrovirales, por ejemplo, secuencias lentivirales, y secuencias virales no lentivirales. El vector híbrido puede referirse a un vector o plásmido de transferencia que comprende secuencias retrovirales, por ejemplo, lentivirales, para transcripción inversa, replicación, integración y/o empaquetamiento.

Los términos "vector lentiviral", "vector de expresión lentiviral" pueden usarse para referirse a plásmidos de transferencia lentivirales y/o partículas lentivirales infecciosas. Cuando se hace referencia aquí a elementos tales como sitios de clonación, promotores, elementos reguladores, ácidos nucleicos heterólogos, etc., se debe entender que las secuencias de estos elementos están presentes en forma de ARN en las partículas lentivirales y están presentes en forma de ADN en los plásmidos de ADN.

En cada extremo del provirus hay estructuras llamadas "repeticiones terminales largas" o "LTR". El término "repetición terminal larga (LTR)" se refiere a dominios de pares de bases ubicados en los extremos de los ADN retrovirales que, en su contexto de secuencia natural, son repeticiones directas y contienen regiones U3, R y U5. Los LTR generalmente proporcionan funciones fundamentales para la expresión de genes retrovirales (por ejemplo, promoción, iniciación y poliadenilación de transcripciones de genes) y para la replicación viral. El LTR contiene numerosas señales reguladoras que incluyen elementos de control de la transcripción, señales de poliadenilación y secuencias necesarias para la replicación e integración del genoma viral. El LTR viral se divide en tres regiones llamadas U3, R y U5. La región U3 contiene los elementos potenciadores y promotores. La región U5 es la secuencia entre el sitio de unión del cebador y la región R y contiene la secuencia de poliadenilación. La región R (repetición) está flanqueada por las regiones U3 y U5. El LTR se compone de regiones U3, R y U5 y aparece en los extremos 5' y 3' del genoma viral. Junto a la 5' LTR hay secuencias necesarias para la transcripción inversa del genoma (el sitio de unión del cebador de ARNt) y para el empaquetamiento eficiente del ARN viral en partículas (el sitio Psi).

Como se usa en el presente documento, el término "señal de empaquetamiento" o "secuencia de empaquetamiento" se refiere a secuencias ubicadas dentro del genoma retroviral que se requieren para la inserción del ARN viral en la cápside o partícula viral, véase, por ejemplo, Clever et al. 1995. J. of Virology, vol. 69, núm. 4; pp. 2101-2109. Varios vectores retrovirales usan la señal de empaquetamiento mínima (también conocida como la secuencia psi [Ψ]) necesaria para la encapsidación del genoma viral. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, los términos "secuencia de empaquetamiento", "señal de empaquetamiento", "psi" y el símbolo "Ψ" se usan en referencia a la secuencia no codificante requerida para la encapsidación de cadenas de ARN retrovirales durante la formación de partículas virales.

Los vectores pueden comprender 5' LTR modificados y/o 3' LTR. Cualquiera o ambos de los LTR pueden comprender una o más modificaciones que incluyen, pero no se limitan a, una o más eliminaciones, inserciones o sustituciones. Las modificaciones del 3' LTR a menudo se realizan para mejorar la seguridad de los sistemas lentivirales o retrovirales al hacer que los virus sean defectuosos en la replicación. Como se usa en el presente documento, el término "defectuoso en la replicación" se refiere a virus que no es capaz de una replicación completa y efectiva de tal manera que no se producen viriones infecciosos (por ejemplo, progenie lentiviral con replicación defectuosa). El término "competente en replicación" se refiere a virus de tipo salvaje o virus mutante que es capaz de replicarse, de modo que la replicación viral del virus es capaz de producir viriones infecciosos (por ejemplo, progenie lentiviral competente en replicación).

Los vectores "autoinactivadores" (SIN) se refieren a vectores defectuosos de replicación, por ejemplo, vectores retrovirales o lentivirales, en los que la región (3') potenciadora-promotora de LTR derecha, conocida como la región U3, ha sido modificada (por ejemplo, por eliminación o sustitución) para evitar la transcripción viral más allá de la primera ronda de replicación viral. Esto se debe a que la región LTR U3 derecha (3') se usa como plantilla para la región LTR U3 izquierda (5') durante la replicación viral y, por lo tanto, la transcripción viral no se puede hacer sin el promotor-potenciador U3. El 3' LTR puede modificarse de modo que la región U5 se reemplace, por ejemplo, con una secuencia de poli (A) ideal. Cabe señalar que también se incluyen modificaciones a los LTR, tales como modificaciones a los 3' LTR, 5' LTR o ambos 3' y 5' LTR.

Se proporciona una mejora de seguridad adicional reemplazando la región U3 del 5' LTR con un promotor heterólogo para impulsar la transcripción del genoma viral durante la producción de partículas virales. Ejemplos de promotores heterólogos que se pueden usar incluyen, por ejemplo, virus simio viral 40 (SV40) (por ejemplo, temprano o tardío), citomegalovirus (CMV) (por ejemplo, precoz inmediato), virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), virus del sarcoma de Rous (RSV) y promotores del virus del herpes simple (HSV) (timidina quinasa). Los promotores típicos pueden conducir altos niveles de transcripción de una manera independiente de Tat. Este reemplazo reduce la posibilidad de recombinación para generar virus competentes para la replicación porque no hay una secuencia U3 completa en el sistema de producción de virus. El promotor heterólogo puede tener ventajas adicionales para controlar la forma en que se transcribe el genoma viral. Por ejemplo, el promotor heterólogo puede ser inducible, de modo que

la transcripción de todo o parte del genoma viral ocurrirá solo cuando los factores de inducción estén presentes. Los factores de inducción incluyen, pero no se limitan a, uno o más compuestos químicos o las condiciones fisiológicas como la temperatura o el pH, en las que se cultivan las células huésped.

Los vectores virales pueden comprender un elemento TAR. El término "TAR" se refiere al elemento genético de "respuesta a transactivación" ubicado en la región R de las LTR lentivirales (por ejemplo, VIH). Este elemento interactúa con el elemento genético transactivador lentiviral (tat) para mejorar la replicación viral. Sin embargo, este elemento no se requiere en realizaciones en las que la región U3 de la LTR 5' se reemplaza por un promotor heterólogo.

La "región R" se refiere a la región dentro de las LTR retrovirales que comienzan en el inicio del grupo de protección (es decir, el inicio de la transcripción) y terminan inmediatamente antes del comienzo del tracto poli A. La región R también se define como flanqueada por las regiones U3 y U5. La región R desempeña un papel durante la transcripción inversa al permitir la transferencia de ADN naciente de un extremo del genoma al otro.

Como se usa en el presente documento, el término "elemento FLAP" se refiere a un ácido nucleico cuya secuencia incluye el tracto central de polipurina y las secuencias de terminación central (cPPT y CTS) de un retrovirus, por ejemplo, VIH-1 o VIH-2. Los elementos FLAP adecuados se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 6,682,907 y en Zennou, et al., 2000, Cell, 101:173. Durante la transcripción inversa del VIH-1, la iniciación central del ADN de cadena positiva en el tracto central de polipurina (cPPT) y la terminación central en la secuencia de terminación central (CTS) conducen a la formación de una estructura de ADN de tres cadenas: el VIH-1 FLAP de ADN central. Si bien no desea estar sujeto a ninguna teoría, el FLAP de ADN puede actuar como un determinante cis-activo de la importación nuclear del genoma lentiviral y/o puede aumentar el título del virus. Las cadenas principales de vectores retrovirales o lentivirales pueden comprender uno o más elementos FLAP aguas arriba o corriente abajo de los genes heterólogos de interés en los vectores. Por ejemplo, un plásmido de transferencia puede incluir un elemento FLAP. Un vector puede comprender un elemento FLAP aislado de VIH-1.

Los vectores de transferencia retrovirales o lentivirales pueden comprender uno o más elementos de exportación. El término "elemento de exportación" se refiere a un elemento regulador postranscripcional que actúa en cis que regula el transporte de una transcripción de ARN desde el núcleo al citoplasma de una célula. Ejemplos de elementos de exportación de ARN incluyen, pero no se limitan a, el elemento de respuesta a la revolución del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (RRE) (véase, por ejemplo, Cullen et al., 1991. J. Virol. 65: 1053; y Cullen et al., 1991. Cell 58: 423), y el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis B (HPRE). En general, el elemento de exportación de ARN se coloca dentro de la UTR 3' de un gen, y se puede insertar como una o múltiples copias.

La expresión de secuencias heterólogas en vectores virales puede aumentarse incorporando elementos reguladores postranscripcionales, sitios de poliadenilación eficientes y, opcionalmente, señales de terminación de la transcripción en los vectores. Una variedad de elementos reguladores postranscripcionales puede aumentar la expresión de un ácido nucleico heterólogo en la proteína, por ejemplo, elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE; Zufferey et al., 1999, J. Virol., 73: 2886); el elemento regulador postranscripcional presente en el virus de la hepatitis B (HPRE) (Huang et al., Mol. Cell. Biol., 5: 3864); y similares (Liu et al., 1995, Genes Dev., 9: 1766). Los vectores pueden comprender un elemento regulador postranscripcional como un WPRE o HPRE Los vectores pueden carecer o no comprender un elemento regulador postranscripcional (PTE) como un WPRE o HPRE porque en algunos casos estos elementos aumentan el riesgo de transformación celular y/o no aumentar sustancial o significativamente la cantidad de transcripción de ARNm o aumentar la estabilidad del ARNm. Por lo tanto, los vectores pueden carecer o no comprender un PTE. En otras realizaciones, los vectores carecen o no comprenden un WPRE o HPRE como una medida de seguridad adicional.

Los elementos que dirigen la terminación eficiente y la poliadenilación de las transcripciones de ácido nucleico heterólogo aumentan la expresión del gen heterólogo. Las señales de terminación de la transcripción se encuentran generalmente corriente abajo de la señal de poliadenilación. Los vectores pueden comprender una secuencia de poliadenilación 3' de un polinucleótido que codifica un polipéptido para ser expresado. El término "sitio poliA" o "secuencia poliA" como se usa en el presente documento denota una secuencia de ADN que dirige tanto la terminación como la poliadenilación de la transcripción de ARN naciente por la ARN polimerasa II. Las secuencias de poliadenilación pueden promover la estabilidad del ARNm mediante la adición de una cola de poliA al extremo 3' de la secuencia de codificación y, por lo tanto, contribuir a una mayor eficiencia por transcripción. La poliadenilación eficiente de la transcripción recombinante es deseable ya que las transcripciones que carecen de una cola poli A son inestables y se degradan rápidamente. Ejemplos ilustrativos de señales de poliA que se pueden usar en un vector incluyen una secuencia de poliA ideal (por ejemplo, AATAAA, ATTAAA, AGTAAA), una secuencia de poliA de hormona de crecimiento bovina (BGHpA), una secuencia de poliA de β-globina de conejo (rβgpA) o otra secuencia de poliA heteróloga o endógena adecuada conocida en la técnica.

Un vector retroviral o lentiviral puede comprender además uno o más elementos aislantes. Los elementos aislantes pueden contribuir a proteger las secuencias expresadas por lentivirus, por ejemplo, polipéptidos terapéuticos, de los efectos del sitio de integración, que pueden estar mediados por elementos que actúan en cis presentes en el ADN genómico y conducir a la expresión desregulada de secuencias transferidas (es decir, efecto de posición; Véase, por

ejemplo, Burgess-Beusse et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci., Estados Unidos, 99: 16433; y Zhan et al., 2001, Hum. Genet., 109: 471). Los vectores de transferencia pueden comprender uno o más elemento aislante el 3' LTR y tras la integración del provirus en el genoma del huésped, el provirus comprende el uno o más aislantes tanto en el 5' LTR como en el 3' LTR, en virtud de duplicar el 3' LTR. Los aisladores adecuados para su uso incluyen, entre otros, el aislante de β-globina de pollo (véase Chung et al., 1993. Cell 74: 505; Chung et al., 1997. PNAS 94: 575; and Bell et al., 1999. Cell 98: 387). Ejemplos de elementos aislantes incluyen, entre otros, un aislante de un locus de β-globina, como el pollo HS4.

La mayoría o la totalidad de las secuencias del esqueleto del vector viral pueden derivarse de un lentivirus, por ejemplo, VIH-1. Sin embargo, debe entenderse que pueden usarse muchas fuentes diferentes de secuencias retrovirales y/o lentivirales, o pueden combinarse y numerosas sustituciones y alteraciones en ciertas secuencias lentivirales sin afectar la capacidad de un vector de transferencia para realizar las funciones descrito aquí. Además, se conoce una variedad de vectores lentivirales en la técnica, véase Naldini et al., (1996a, 1996b y 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, Patente de los Estados Unidos Nos. 6,013,516; y 5,994,136, muchos de los cuales pueden adaptarse para producir un vector viral o un plásmido de transferencia.

Los vectores pueden comprender un promotor unido operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido CAR. Los vectores pueden tener una o más LTR, en donde cualquiera de las LTR comprende una o más modificaciones, tales como una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos. Los vectores pueden comprender además uno de más elementos accesorios para aumentar la eficiencia de transducción (por ejemplo, un cPPT/FLAP), empaque viral (por ejemplo, una señal de empaque Psi (Ψ), RRE) y/u otros elementos que aumentan la expresión terapéutica del gen (por ejemplo, secuencias de poli (A)), y pueden comprender opcionalmente un WPRE o HPRE.

El vector de transferencia puede comprender una LTR retroviral izquierda (5'); un FLAP central de tracto de polipurina/ADN (cPPT/FLAP); un elemento de exportación retroviral; un promotor activo en una célula T, operativamente unido a un polinucleótido que codifica el polipéptido CAR contemplado en el presente documento; y un LTR retroviral derecho (3'); y opcionalmente un WPRE o HPRE.

El vector de transferencia puede comprender una LTR retroviral izquierda (5'); un elemento de exportación retroviral; un promotor activo en una célula T, operativamente unido a un polinucleótido que codifica el polipéptido CAR contemplado en el presente documento; un LTR retroviral derecho (3'); y una secuencia de poli (A); y opcionalmente un WPRE o HPRE. También se proporciona un vector lentiviral que comprende: un LTR izquierdo (5'); un cPPT/FLAP; un RRE; un promotor activo en una célula T, operativamente unido a un polinucleótido que codifica el polipéptido CAR contemplado en el presente documento; un LTR derecho (3'); y una secuencia de poliadenilación; y opcionalmente un WPRE o HPRE.

También se proporciona un vector lentiviral que comprende: un LTR de VIH-1 izquierdo (5'); una señal de empaque Psi (Ψ); un cPPT/FLAP; un RRE; un promotor activo en una célula T, operativamente unido a un polinucleótido que codifica el polipéptido CAR contemplado en el presente documento; un derecho (3') autoinactivador (SIN) HIV-1 LTR; y una secuencia de poliadenilación de β-globina de conejo; y opcionalmente un WPRE o HPRE.

También se proporciona un vector que comprende: al menos un LTR; un FLAP central de tracto de polipurina/ADN (cPPT/FLAP); un elemento de exportación retroviral; y un promotor activo en una célula T, operativamente unido a un polinucleótido que codifica el polipéptido CAR contemplado en el presente documento; y opcionalmente un WPRE o HPRE.

También se proporciona un vector que comprende al menos un LTR; un cPPT/FLAP; un RRE; un promotor activo en una célula T, operativamente unido a un polinucleótido que codifica el polipéptido CAR contemplado en el presente documento; y una secuencia de poliadenilación; y opcionalmente un WPRE o HPRE.

También se proporciona al menos una LTR SIN HIV-1; una señal de empaque Psi (Ψ); un cPPT/FLAP; un RRE; un promotor activo en una célula T, operativamente unido a un polinucleótido que codifica el polipéptido CAR contemplado en el presente documento; y una secuencia de poliadenilación de β-globina de conejo; y opcionalmente un WPRE o HPRE.

El vector puede ser un vector viral integrador.

El vector puede ser un vector viral episomal o no integrante.

Los vectores contemplados en el presente documento pueden comprender retrovirus defectuosos de integración o no integrantes. Un retrovirus o lentivirus "con integración defectuosa" puede referirse a un retrovirus o lentivirus que tiene una integrasa que carece de la capacidad de integrar el genoma viral en el genoma de las células huésped. La proteína integrasa puede mutar para disminuir específicamente su actividad integrasa. Los vectores lentivirales incompetentes para la integración se obtienen modificando el gen pol que codifica la proteína integrasa, dando como resultado un gen pol mutado que codifica una integrasa deficiente integrativa. Tales vectores virales incompetentes para la integración se han descrito en la Solicitud de Patente WO 2006/010834. Las mutaciones ilustrativas en el gen pol del VIH-1 adecuado para reducir la actividad de la integrasa incluyen, entre otras: H12N, H12C, H16C, H16V, S81 R,

D41A, K42A, H51A, Q53C, D55V, D64E, D64V, E69A, K71A , E85A, E87A, D116N, D1161, D116A, N120G, N1201, N120E, E152G, E152A, D35E, K156E, K156A, E157A, K159E, K159A, K160A, R166A, D167A, E170A, H171A, K173A, K186Q, K186T, K188T, E198A, R199c, R199T, R199A, D202A, K211A, Q214L, Q216L, Q221 L, W235F, W235E, K236S, K236A, K246A, G247W, D253A, R262A, R263A and K264H.

Las mutaciones ilustrativas en el gen pol del VIH-1 adecuado para reducir la actividad integrasa incluyen, pero no se limitan a: D64E, D64V, E92K, D116N, D1161, D116A, N120G, N1201, N120E, E152G, E152A, D35E, K156E, K156A, E157A, K159E, K159A, W235F y W235E.

Una integrasa puede comprender una mutación en uno o más de los aminoácidos, D64, D116 o E152. Una integrasa puede comprender una mutación en los aminoácidos, D64, D116 y E152. Una integrasa defectuosa de VIH-1 puede comprender una mutación D64V.

Una "célula huésped" incluye células sometidas a electroporación, transfectadas, infectadas o transducidas in vivo, ex vivo o in vitro con un vector recombinante o un polinucleótido. Las células huésped pueden incluir células de empaquetamiento, células productoras y células infectadas con vectores virales. Las células huésped infectadas con el vector viral de la invención se administran a un sujeto que necesita terapia. El término "célula diana" se puede usar indistintamente con la célula huésped y se refiere a células transfectadas, infectadas o transducidas de un tipo de célula deseado. La célula diana puede ser una célula T.

La producción de partículas virales a gran escala a menudo es necesaria para lograr un título viral razonable. Las partículas virales se producen al transfectar un vector de transferencia en una línea celular de empaquetamiento que comprende genes virales estructurales y/o accesorios, por ejemplo, genes gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpu, vpx o nef u otros genes retrovirales.

Como se usa en el presente documento, el término "vector de empaquetamiento" se refiere a un vector de expresión o vector viral que carece de una señal de empaquetamiento y comprende un polinucleótido que codifica uno, dos, tres, cuatro o más genes estructurales y/o accesorios virales. Típicamente, los vectores de empaquetamiento se incluyen en una célula de empaquetamiento, y se introducen en la célula mediante transfección, transducción o infección. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos de transfección, transducción o infección. Se puede introducir un vector de transferencia retroviral/lentiviral en una línea celular de empaquetamiento, mediante transfección, transducción o infección, para generar una célula productora o línea celular. Los vectores de empaquetamiento pueden introducirse en células humanas o líneas celulares mediante métodos estándar que incluyen, por ejemplo, transfección con fosfato de calcio, lipofección o electroporación. Los vectores de empaquetamiento pueden introducirse en las células junto con un marcador seleccionable dominante, tal como neomicina, higromicina, puromicina, blastocidina, zeocina, timidina quinasa, DHFR, Gln sintetasa o ADA, seguido de selección en presencia del fármaco apropiado y aislamiento de clones. Un gen marcador seleccionable puede estar unido físicamente a genes que codifican por el vector de empaquetamiento, por ejemplo, por IRES o péptidos virales autoescindibles.

Las proteínas de la envoltura viral (env) determinan el rango de células huésped que finalmente pueden infectarse y transformarse mediante retrovirus recombinantes generados a partir de las líneas celulares. En el caso de los lentivirus, como VIH-1, VIH-2, SIV, FIV y EIV, las proteínas env incluyen gp41 y gp120. Preferiblemente, las proteínas env virales expresadas por las células de empaquetamiento están codificadas en un vector separado de los genes gag y pol virales, como se ha descrito previamente.

Ejemplos ilustrativos de genes env derivados de retrovirales que se pueden emplear incluyen, pero no se limitan a: envolturas MLV, sobre 10A1, BAEV, FeLV-B, RD114, SSAV, Ébola, Sendai, FPV (virus de la peste de las aves), y envolturas de virus de la gripe. De manera similar, los genes que codifican las envolturas de los virus de ARN (por ejemplo, familias de virus de ARN de Picornaviridae, Calciviridae, Astroviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Reoviridae, Birnaviridae, Retroviridae) se pueden utilizar virus de ADN (familias de Hepadnaviridae, Circoviridae, Parvoviridae, Papovaviridae, Adenoviridae, Herpesviridae, Poxyiridae e Iridoviridae). Ejemplos representativos incluyen FeLV, VEE, HFVW, WDSV, SFV, Rabia, ALV, BIV, BLV, EBV, CAEV, SNV, ChTLV, STLV, MPMV, SMRV, RAV, FuSV, MH2, AEV, AMV, CT10 y EIAV.

Las proteínas de la envoltura para pseudotipificar un virus incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los siguientes virus: Influenza A tal como H1N1, H1N2, H3N2 y H5N1 (gripe aviar), Influenza B, virus de Influenza C, virus de hepatitis A, Hepatitis Virus B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D, virus de la hepatitis E, rotavirus, cualquier virus del grupo de virus Norwalk, adenovirus entéricos, parvovirus, virus de la fiebre del dengue, viruela del mono, mononegavirales, lissavirus como el virus de la rabia, el virus del murciélago de Lagos, Mokola virus, virus Duvenhage, virus murciélago europeo 1 y 2 y virus murciélago australiano, efemerovirus, vesiculovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus del herpes como el virus Herpes simplex tipos 1 y 2, varicela zoster, citomegalovirus, virus Epstein-Bar (EBV), virus del herpes humano (HHV), virus del herpes humano tipo 6 y 8, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del papiloma, virus del gamma herpes murino, virus de la arena como el virus de la fiebre hemorrágica argentina, virus de la fiebre hemorrágica boliviana, fev hemorrágico asociado a virus Sabia de la fiebre, virus de la fiebre hemorrágica venezolana, virus de la fiebre de Lassa, virus de Machupo, virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), Bunyaviridiae, como el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, Hantavirus, fiebre

hemorrágica con virus causante del síndrome renal, virus de la fiebre del Valle del Rift, Filoviridae (filovirus) incluyendo la fiebre hemorrágica del Ébola y la fiebre hemorrágica de Marburg, Flaviviridae incluyendo el virus de la enfermedad de Kaysanur Forest, el virus de la fiebre hemorrágica de Omsk, el virus causante de la encefalitis transmitida por garrapatas y Paramyxoviridae como el virus Hendra y el virus Nipah, la variola mayor y la variola menor (viruela), los alfavirus como Virus de la encefalitis equina venezolana, virus de la encefalitis equina del este, virus de la encefalitis equina del oeste, coronavirus asociado al SARS (SARS-CoV), virus del Nilo Occidental, cualquier virus causante de encefalitis.

Se proporcionan células de empaquetamiento que producen retrovirus recombinantes, por ejemplo, lentivirus, seudotipadas con la glicoproteína VSV-G.

Los términos "pseudotipo" o "pseudotipificado" tal como se usan en el presente documento, se refieren a un virus cuyas proteínas de la envoltura viral se han sustituido con las de otro virus que posee características preferibles. Por ejemplo, el VIH se puede seudotipificar con proteínas de envoltura de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), lo que permite que el VIH infecte una gama más amplia de células porque las proteínas de la envoltura del VIH (codificadas por el gen env) normalmente dirigen el virus a la presentación de células $CD4^+$. Las proteínas de la envoltura lentiviral se seudotipan con VSV-G. Se proporcionan células de empaquetamiento que producen retrovirus recombinantes, por ejemplo, lentivirus, seudotipificados con la glicoproteína de la envoltura de VSV-G.

Como se usa en el presente documento, el término "líneas celulares de empaquetamiento" se usa en referencia a líneas celulares que no contienen una señal de empaquetamiento, pero que expresan estable o transitoriamente proteínas estructurales virales y enzimas de replicación (por ejemplo, gag, pol y env) que son necesarias para el correcto empaquetamiento de partículas virales. Se puede emplear cualquier línea celular adecuada para preparar células de empaquetamiento. En general, las células son células de mamífero. Las células utilizadas para producir la línea celular de empaquetamiento pueden ser células humanas. Las líneas celulares adecuadas que pueden usarse incluyen, por ejemplo, células CHO, células BHK, células MDCK, células C3H 10T1/2, células FLY, células Psi-2, células BOSC 23, células PA317, células WEHI, células COS, células BSC 1, células BSC 40, células BMT 10, células VERO, células W138, células MRC5, células A549, células HT1080, células 293, células 293T, células B-50, células 3T3, células NIH3T3, células HepG2, células Saos-2, Células Huh7, células HeLa, células W163, células 211 y células 211A. Las células de empaquetamiento son preferiblemente células 293, células 293T o células A549. Las células son preferiblemente pueden ser células A549.

Como se usa en el presente documento, el término "línea celular productora" se refiere a una línea celular que es capaz de producir partículas retrovirales recombinantes, que comprende una línea celular de empaquetamiento y una construcción de vector de transferencia que comprende una señal de empaquetamiento. La producción de partículas virales infecciosas y soluciones madre virales se puede llevar a cabo utilizando técnicas convencionales. Los métodos para preparar soluciones madre virales son conocidos en la técnica y son ilustrados, por ejemplo, por Y. Soneoka et al. (1995) Nucl. Acids Res. 23: 628-633, y N. R. Landau et al. (1992) J. Virol. 66: 5110-5113. Las partículas de virus infecciosas pueden recogerse de las células de empaquetamiento utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, las partículas infecciosas se pueden recoger por lisis celular, o la colección del sobrenadante del cultivo celular, como se conoce en la técnica. Opcionalmente, las partículas de virus recogidas pueden purificarse si se desea. Las técnicas de purificación adecuadas son bien conocidas por los expertos en la materia.

El suministro de uno o más genes u otra secuencia de polinucleótidos utilizando un vector retroviral o lentiviral mediante infección viral en lugar de mediante transfección se denomina "transducción". Los vectores retrovirales pueden transducirse a una célula a través de la infección y la integración de provirus. Una célula diana, por ejemplo, una célula T, se "transduce" si comprende un gen u otra secuencia de polinucleótidos entregada a la célula por infección usando un vector viral o retroviral. Una célula transducida puede comprender uno o más genes u otras secuencias de polinucleótidos administradas por un vector retroviral o lentiviral en su genoma celular.

Las células huésped transducidas con el vector viral que expresa uno o más polipéptidos, se pueden administrar a un sujeto para tratar y/o prevenir una neoplasia maligna de células B. Se pueden encontrar otros métodos relacionados con el uso de vectores virales en terapia génica, que pueden utilizarse, por ejemplo, Kay, M. A. (1997) Chest 111(6 Supp.): 138S-142S; Ferry, N. and Heard, J. M. (1998) Hum. Gene Ther. 9: 1975-81; Shiratory, Y. et al. (1999) Liver 19: 265-74; Oka, K. et al. (2000) Curr. Opin. Lipidol 11: 179-86; Thule, P. M. and Liu, J. M. (2000) Gene Ther. 7: 1744-52; Yang, N. S. (1992) Crit. Rev. Biotechnol. 12: 335-56; Alt, M. (1995) J. Hepatol. 23: 746-58; Brody, S. L. and Crystal, R. G. (1994) Ann. N.Y. Acad. Sci. 716: 90-101; Strayer, D. S. (1999) Expert Opin. Investig. Drugs 8: 2159-2172; Smith-Arica, J. R. and Bartlett, J. S. (2001) Curr. Cardiol Rep. 3: 43-49; y Lee, H. C. et al. (2000) Nature 408: 483-8.

G. Células modificadas genéticamente

Se contemplan células modificadas genéticamente para expresar los CAR contemplados en el presente documento, para uso en el tratamiento de afecciones relacionadas con células B. Como se usa en el presente documento, el término " manipulado genéticamente" o "modificado genéticamente" se refiere a la adición de material genético adicional en forma de ADN o ARN en el material genético total en una célula. Los términos "células genéticamente modificadas", "células modificadas" y "células redirigidas" se usan indistintamente. Como se usa en este documento, el término "terapia génica" se refiere a la introducción de material genético adicional en forma de ADN o ARN en el

material genético total en una célula que restaura, corrige o modifica la expresión de un gen, o con el fin de que exprese un polipéptido terapéutico, por ejemplo, un CAR.

Los CAR contemplados en el presente documento pueden introducirse y expresarse en células efectoras inmunes para redirigir su especificidad a un antígeno objetivo de interés, por ejemplo, un polipéptido BCMA. Una "célula efectora inmune" es cualquier célula del sistema inmune que tiene una o más funciones efectoras (por ejemplo, actividad citotóxica para matar células, secreción de citoquinas, inducción de ADCC y/o CDC).

Las células efectoras inmunitarias pueden ser autólogas/autogénicas ("propias") o no autólogas ("no propias", por ejemplo, alogénicas, singénicas o xenogénicas).

"Autólogo", como se usa en el presente documento, se refiere a células del mismo sujeto.

"Alogénico", como se usa en el presente documento, se refiere a células de la misma especie que se diferencian genéticamente de la célula en comparación.

"Singénico", como se usa en el presente documento, se refiere a células de un sujeto diferente que son genéticamente idénticas a la célula en comparación.

"Xenogénico", como se usa en el presente documento, se refiere a células de una especie diferente a la célula en comparación. Preferiblemente, las células son células efectoras inmunitarias ilustrativas alogénicas usadas con los CAR contemplados en el presente documento incluyen linfocitos T. Los términos "células T" o "linfocitos T" son reconocidos en la técnica y pretenden incluir timocitos, linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros, linfocitos T en reposo o linfocitos T activados. Una célula T puede ser una célula T auxiliar (Th), por ejemplo, una célula T auxiliar 1 (Th1) o una célula T auxiliar 2 (Th2). La célula T puede ser una célula T auxiliar (HTL; célula T $CD4^+$), una célula T $CD4^+$, una célula T citotóxica (CTL; célula T $CD8^+$), una célula T $CD4^+$ $CD8^+$, una célula T CD4-CD8 o cualquier otro subconjunto de células T. Otras poblaciones ilustrativas de células T adecuadas para su uso incluyen células T ingenuas y células T de memoria.

Como entendería un experto en la materia, también se pueden usar otras células como células efectoras inmunes con los CAR como se describe en el presente documento. En particular, las células efectoras inmunes también incluyen células NK, células NKT, neutrófilos y macrófagos. Las células efectoras inmunitarias también incluyen progenitores de células efectoras en las que dichas células progenitoras pueden inducirse a diferenciarse en células efectoras inmunes in vivo o in vitro. Por lo tanto, la célula efectora inmune puede incluir progenitores de células efectoras inmunes tales como células madre hematopoyéticas (HSC) contenidas dentro de la población de células $CD34^+$ derivadas de sangre del cordón umbilical, médula ósea o sangre periférica movilizada que, tras la administración en un sujeto, se diferencian en células efectoras inmunes maduras, o que pueden ser inducidas in vitro para diferenciarse en células efectoras inmunes maduras.

Como se usa en el presente documento, las células efectoras inmunes genéticamente modificadas para contener CAR específica de BCMA pueden denominarse "células efectoras inmunes redireccionadas específicas de BCMA".

El término "célula $CD34^+$", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que expresa la proteína CD34 en su superficie celular. "CD34", como se usa en el presente documento, se refiere a una glucoproteína de la superficie celular (por ejemplo, proteína sialomucina) que a menudo actúa como un factor de adhesión célula-célula y está implicada en la entrada de células T en los ganglios linfáticos. La población de células $CD34^+$ contiene células madre hematopoyéticas (HSC), que tras la administración a un paciente se diferencian y contribuyen a todos los linajes hematopoyéticos, incluidas las células T, las células NK, las células NKT, los neutrófilos y las células del linaje de monocitos/macrófagos.

También se proporcionan métodos para fabricar las células efectoras inmunes que expresan el CAR contemplado aquí. El método puede comprender transfectar o transducir células efectoras inmunes aisladas de un individuo de modo que las células efectoras inmunes expresen uno o más CAR como se describe en el presente documento. Las células efectoras inmunes pueden aislarse de un individuo y modificarse genéticamente sin más manipulación in vitro. Dichas células se pueden volver a administrar directamente al individuo. Las células efectoras inmunitarias pueden activarse primero y estimularse para que proliferen in vitro antes de modificarse genéticamente para expresar un CAR. A este respecto, las células efectoras inmunes pueden cultivarse antes y/o después de ser modificadas genéticamente (es decir, transducidas o transfectadas para expresar un CAR contemplado en el presente documento).

Antes de la manipulación o modificación genética in vitro de las células efectoras inmunes descritas en este documento, la fuente de células puede obtenerse de un sujeto. En particular, las células efectoras inmunes modificadas con CAR pueden comprender células T. Las células T se pueden obtener de varias fuentes, que incluyen, entre otras, células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre del cordón umbilical, tejido de timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido de bazo, y tumores. Las células T se pueden obtener de una unidad de sangre recolectada de un sujeto usando cualquier número de técnicas conocidas por la persona experta, tales como sedimentación, por ejemplo, separación FICOLL™. Las células de la sangre circulante de un individuo pueden obtenerse por aféresis. El producto de aféresis típicamente contiene linfocitos, que incluyen células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos

y plaquetas. Las células recogidas por aféresis pueden lavarse para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un regulador o medio apropiado para su posterior procesamiento. Las células se pueden lavar con PBS o con otra solución adecuada que carezca de calcio, magnesio y la mayoría, si no todos los demás, cationes divalentes. Como apreciarían los expertos en la materia, una etapa de lavado puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como el uso de una centrífuga de flujo semiautomatizado. Por ejemplo, el procesador celular Cobe 2991, el Baxter CytoMate o similares. Después del lavado, las células se pueden resuspender en una variedad de reguladores biocompatibles u otra solución salina con o sin regulador. Los componentes indeseables de la muestra de aféresis pueden eliminarse en el medio de cultivo celular directamente resuspendido.

Las células T pueden aislarse de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) lisando los glóbulos rojos y agotando los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™. Una subpoblación específica de células T, que expresa uno o más de los siguientes marcadores: CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA y CD45RO, puede aislarse adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. En una realización, una subpoblación específica de células T que expresa CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA y CD45RO se aísla adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. Por ejemplo, el enriquecimiento de una población de células T por selección negativa se puede lograr con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie únicos para las células seleccionadas negativamente. Un método para usar en este documento es la clasificación y/o selección de células mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que usa un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células $CD4^+$ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales típicamente incluye anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8. La citometría de flujo y la clasificación celular también se pueden usar para aislar las poblaciones celulares de interés para su uso.

Las PBMC pueden modificarse directamente genéticamente para expresar CAR utilizando los métodos contemplados en el presente documento. Después del aislamiento de PBMC, los linfocitos T pueden aislarse aún más y, tanto los linfocitos T citotóxicos como los auxiliares pueden clasificarse en subpoblaciones de células T ingenuas, de memoria y efectoras antes o después de la modificación y/o expansión genética.

Las células $CD8^+$ pueden obtenerse usando métodos estándar. Las células $CD8^+$ pueden clasificarse adicionalmente en células ingenuas, de memoria central y efectoras mediante la identificación de antígenos de la superficie celular que están asociados con cada uno de esos tipos de células $CD8^+$.

Los linfocitos T $CD8^+$ ingenuos pueden caracterizarse por la expresión de marcadores fenotípicos de células T ingenuas que incluyen CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD 127 y CD45RA.

Las células T de memoria pueden estar presentes en los subconjuntos $CD62L^+$ y $CD62L^-$ de linfocitos de sangre periférica $CD8^+$. Las PBMC se clasifican en fracciones CD62L-$CD8^+$ y $CD62L^+CD8^+$ después de la tinción con anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L. La expresión de marcadores fenotípicos de las células T de memoria central incluye CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 y CD127 puede ser negativa para la granzima B. Las células T de memoria central pueden ser células T $CD45RO^+$, $CD62L^+$, $CD8^+$.

Las células T efectoras pueden ser negativas para CD62L, CCR7, CD28 y CD127, y positivas para granzima B y perforina.

Las células T $CD4^+$ pueden clasificarse adicionalmente en subpoblaciones. Por ejemplo, las células auxiliares T $CD4^+$ se pueden clasificar en células ingenuas, de memoria central y efectoras mediante la identificación de poblaciones celulares que tienen antígenos de superficie celular. Los linfocitos $CD4^+$ se pueden obtener por métodos estándar. Los linfocitos T $CD4^+$ ingenuos pueden ser células T $CD45RO^-$, $CD45RA^+$, $CD62L^+$ $CD4^+$. Las células $CD4^+$ de memoria central pueden ser CD62L positivas y CD45RO positivas. Las células efectoras $CD4^+$ pueden ser CD62L y CD45RO negativas.

Las células efectoras inmunes, tales como las células T, pueden modificarse genéticamente después del aislamiento usando métodos conocidos, o las células efectoras inmunes pueden activarse y expandirse (o diferenciarse en el caso de progenitores) in vitro antes de ser modificadas genéticamente. Las células efectoras inmunes, como las células T, se modifican genéticamente con los receptores de antígeno quiméricos contemplados en el presente documento (por ejemplo, se transducen con un vector viral que comprende un ácido nucleico que codifica un CAR) y luego se activan y expanden in vitro. Las células T pueden activarse y expandirse antes o después de la modificación genética para expresar un CAR, utilizando métodos como se describe, por ejemplo, en las Patentes estadounidenses 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7.144.575; 7.067.318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5.883.223; 6.905.874; 6,797,514; 6,867,041; y la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 20060121005.

Generalmente, las células T se expanden por contacto con una superficie que se ha unido a un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3 TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de las células T. Las poblaciones de células T pueden estimularse por contacto con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o por contacto con

un activador de proteína quinasa C (por ejemplo, briostatina) junto con un ionóforo de calcio. También se contempla la coestimulación de moléculas accesorias en la superficie de las células T.

Las PBMC o las células T aisladas pueden ponerse en contacto con un agente estimulante y un agente coestimulador, como los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, generalmente unidos a una perla u otra superficie, en un medio de cultivo con citoquinas apropiadas, como IL -2, IL-7 y/o IL-15. Para estimular la proliferación de células T $CD4^+$ o células T $CD8^+$, un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Ejemplos de un anticuerpo anti-CD28 incluyen 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diacione, Besancon, Francia) pueden usarse al igual que otros métodos comúnmente conocidos en la técnica (Berg et al., Transplant Proc. 30(8): 3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9): 13191328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2): 53-63, 1999). Los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a la misma perla sirven como una célula presentadora de antígeno (APC) "sustituta". Las células T pueden activarse y estimularse para que proliferen con células alimentadoras y anticuerpos y citoquinas apropiados usando métodos tales como los descritos en US6040177; US5827642; y WO2012129514.

APC artificial (aAPC) fabricado mediante manipulación de células K562, U937, 721.221, T2 y C1R para dirigir la expresión y secreción estable, de una variedad de moléculas coestimuladoras y citoquinas. Las aAPC K32 o U32 se pueden usar para dirigir la visualización de una o más moléculas estimuladoras basadas en anticuerpos en la superficie de la célula AAPC. La expresión de varias combinaciones de genes en el aAPC permite la determinación precisa de los requisitos de activación de células T humanas, de modo que las aAPC se pueden adaptar para la propagación óptima de subconjuntos de células T con requisitos de crecimiento específicos y funciones distintas. Las aAPC apoyan el crecimiento ex vivo y la expansión a largo plazo de las células T CD8 humanas funcionales sin requerir la adición de citoquinas exógenas, en contraste con el uso de APC naturales. Las poblaciones de células T pueden expandirse mediante aAPC que expresan una variedad de moléculas coestimuladoras que incluyen, entre otras, CD137L (4-1BBL), CD134L (OX40L) y/o CD80 o CD86. Finalmente, las aAPC proporcionan una plataforma eficiente para expandir las células T genéticamente modificadas y para mantener la expresión de CD28 en las células T CD8. Se hace referencia a los aAPC proporcionados en los documentos WO 03/057171 y US2003/0147869.

Las células $CD34^+$ pueden transducirse con una construcción de ácido nucleico. Las células $CD34^+$ transducidas pueden diferenciarse en células efectoras inmunes maduras in vivo después de la administración a un sujeto, generalmente el sujeto del que se aislaron originalmente las células. Las células $CD34^+$ pueden estimularse in vitro antes de la exposición a o después de ser genéticamente modificadas con un CAR como se describe aquí, con una o más de las siguientes citoquinas: ligando Flt-3 (FLT3), factor de células madre (SCF), crecimiento de megacariocitos y factor de diferenciación (TPO), IL-3 e IL-6 según los métodos descritos previamente (Asheuer et al., 2004; Imren, et al., 2004).

También se proporciona una población de células efectoras inmunes modificadas para el tratamiento del cáncer, las células efectoras inmunes modificadas que comprenden un CAR como se describe en el presente documento. Por ejemplo, se prepara una población de células efectoras inmunes modificadas a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de un paciente diagnosticado con neoplasia maligna de células B descrita en este documento (donantes autólogos). Las PBMC forman una población heterogénea de linfocitos T que pueden ser $CD4^+$, $CD8^+$ o $CD4^+$ y $CD8^+$.

Las PBMC también pueden incluir otros linfocitos citotóxicos tales como células NK o células NKT. Un vector de expresión que lleva la secuencia de codificación de un CAR contemplado en el presente documento puede introducirse en una población de células T de donante humano, células NK o células NKT. Las células T transducidas con éxito que portan el vector de expresión pueden clasificarse usando citometría de flujo para aislar las células T positivas para CD3 y luego propagarse para aumentar el número de estas células T que expresan proteínas CAR además de la activación celular usando anticuerpos anti-CD3 y/o anticuerpos anti-CD28 e IL-2 o cualquier otro método conocido en la técnica como se describe en otra parte del presente documento. Los procedimientos estándar se usan para la crioconservación de células T que expresan las células T de la proteína CAR para almacenamiento y/o preparación para su uso en un sujeto humano. La transducción in vitro, el cultivo y/o la expansión de las células T pueden realizarse en ausencia de productos derivados de animales no humanos tales como suero fetal de ternera y suero fetal bovino. Dado que una población heterogénea de PBMC se modifica genéticamente, las células transducidas resultantes son una población heterogénea de células modificadas que comprende un CAR dirigido a BCMA como se contempla en el presente documento.

Se puede usar una mezcla de, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco o más, diferentes vectores de expresión para modificar genéticamente una población de donantes de células efectoras inmunes en las que cada vector codifica una proteína receptora de antígeno quimérico diferente como se contempla en este documento. Las células efectoras inmunes modificadas resultantes forman una población mixta de células modificadas, con una proporción de las células modificadas que expresan más de una proteína CAR diferente.

También se proporciona un método de almacenamiento de células efectoras inmunes que expresan proteínas CAR murinas, humanas o humanizadas genéticamente que se dirigen a una proteína BCMA, que comprende crioconservar las células efectoras inmunes de modo que las células permanezcan viables tras la descongelación. Una fracción de las células efectoras inmunes que expresan las proteínas CAR puede crioconservarse mediante métodos conocidos en la técnica para proporcionar una fuente permanente de tales células para el tratamiento futuro de pacientes

afectados por la afección relacionada con las células B. Cuando sea necesario, las células efectoras inmunes transformadas criconservadas pueden descongelarse, crecer y expandirse para obtener más células de este tipo.

Como se usa en el presente documento, "crioconservación" se refiere a la conservación de las células mediante enfriamiento a temperaturas bajo cero, tales como (típicamente) 77 K o -196ºC (el punto de ebullición del nitrógeno líquido). Los agentes crioprotectores a menudo se usan a temperaturas bajo cero para evitar que las células se conserven del daño debido a la congelación a bajas temperaturas o al calentamiento a temperatura ambiente. Los agentes crioconservadores y las velocidades de enfriamiento óptimas pueden proteger contra la lesión celular. Los agentes crioprotectores que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, dimetilsulfóxido (DMSO) (Lovelock and Bishop, Nature, 1959; 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, Nature, 1961; 190: 1204-1205), glicerol, polivinilpirrolidina (Rinfret, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1960; 85: 576), y polietilenglicol (Sloviter and Ravdin, Nature, 1962; 196: 48). La velocidad de enfriamiento preferida es de 1° a 3°C/minuto. Después de al menos dos horas, las células T han alcanzado una temperatura de -80ºC y pueden colocarse directamente en nitrógeno líquido (-196ºC) para su almacenamiento permanente, como en un recipiente de almacenamiento criogénico a largo plazo.

H. Métodos de fabricación de células

Las células T fabricadas por los métodos contemplados en el presente documento proporcionan composiciones de inmunoterapia adoptiva mejoradas. Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, se cree que las composiciones de células T fabricadas por los métodos contemplados en el presente documento tienen propiedades superiores, que incluyen una mayor supervivencia, expansión en ausencia relativa de diferenciación y persistencia in vivo. Un método de fabricación de células T puede comprender poner en contacto las células con uno o más agentes que modulan una ruta de señalización de células PI3K. En una realización, un método de fabricación de células T comprende poner en contacto las células con uno o más agentes que modulan una ruta de señalización de células PI3K/Akt/mTOR. En diversas realizaciones, las células T pueden obtenerse de cualquier fuente y ponerse en contacto con el agente durante las fases de activación y/o expansión del proceso de fabricación. Las composiciones de células T resultantes están enriquecidas en células T de desarrollo potente que tienen la capacidad de proliferar y expresar uno o más de los siguientes biomarcadores: CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197 y CD38. Las poblaciones de células que comprenden células T que han sido tratadas con uno o más inhibidores de PI3K pueden enriquecerse para una población de células T $CD8^+$ que coexpresan uno o más o todos los siguientes biomarcadores: CD62L, CD127, CD197 y CD38.

Se pueden fabricar células T modificadas que comprenden niveles mantenidos de proliferación y diferenciación disminuida. Las células T pueden fabricarse estimulando a las células T para que se activen y proliferen en presencia de una o más señales estimuladoras y un agente que es un inhibidor de una vía de señalización de células PI3K.

Las células T pueden modificarse para expresar un CAR anti-BCMA. Las células T pueden modificarse transduciendo las células T con un vector viral que comprende un CAR anti-BCMA contemplado en el presente documento. Las células T pueden modificarse antes de la estimulación y activación en presencia de un inhibidor de una vía de señalización de células PI3K. Las células T pueden modificarse después de la estimulación y activación en presencia de un inhibidor de una vía de señalización de células PI3K. Las células T pueden modificarse dentro de las 12 horas, 24 horas, 36 horas o 48 horas de estimulación y activación en presencia de un inhibidor de una vía de señalización de células PI3K.

Después de activar las células T, las células se cultivan para proliferar. Las células T pueden cultivarse durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, al menos 2 semanas, al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses o más con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más rondas de expansión.

Las composiciones de células T pueden fabricarse en presencia de uno o más inhibidores de la ruta PI3K. Los inhibidores pueden dirigirse a una o más actividades en la ruta o una sola actividad. Sin desear limitarse a ninguna teoría en particular, se contempla que el tratamiento o el contacto de las células T con uno o más inhibidores de la vía PI3K durante las fases de estimulación, activación y/o expansión del proceso de fabricación aumentan preferentemente las células T jóvenes, por lo tanto, produciendo composiciones terapéuticas superiores de células T.

Se proporciona un método para aumentar la proliferación de células T que expresan un receptor de células T manipulado. Dichos métodos pueden comprender, por ejemplo, recolectar una fuente de células T de un sujeto, estimular y activar las células T en presencia de uno o más inhibidores de la vía PI3K, modificar las células T para expresar un CAR anti-BCMA, por ejemplo, un CAR anti-BCMA02 y expandiendo las células T en cultivo.

Un método para producir poblaciones de células T enriquecidas para la expresión de uno o más de los siguientes biomarcadores: CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197 y CD38. Las células T jóvenes pueden comprender uno o más de, o todos los siguientes marcadores biológicos: CD62L, CD127, CD197 y CD38. Las células T jóvenes pueden carecer de expresión de CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 y LAG3. Como se discute en otra parte en el presente documento, los niveles de expresión de biomarcadores de células T jóvenes es relativo a los niveles de expresión de dichos marcadores en células T más diferenciadas o poblaciones de células efectoras inmunes.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) pueden usarse como fuente de células T en los métodos de fabricación de células T contemplados en el presente documento. Las PBMC forman una población heterogénea de linfocitos T que pueden ser $CD4^+$, $CD8^+$ o $CD4^+$ y $CD8^+$ y pueden incluir otras células mononucleares como monocitos, células B, células NK y células NKT. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un TCR o CAR diseñado por manipulación contemplado en el presente documento puede introducirse en una población de células T de donante humano, células NK o células NKT. Las células T transducidas con éxito que transportan el vector de expresión pueden clasificarse usando citometría de flujo para aislar las células T positivas para CD3 y luego propagarse para aumentar el número de células T modificadas además de la activación celular usando anticuerpos anti-CD3 y/o anticuerpos anti-CD28 e IL-2, IL-7 y/o IL-15 o cualquier otro método conocido en la técnica como se describe en otra parte del presente documento.

Los métodos de fabricación contemplados en el presente documento pueden comprender además la crioconservación de células T modificadas para almacenamiento y/o preparación para uso en un sujeto humano. Las células T se crioconservan de tal manera que las células permanecen viables al descongelarse. Cuando sea necesario, las células efectoras inmunes transformadas crioconservadas pueden descongelarse, crecer y expandirse para obtener más células de este tipo. Como se usa en el presente documento, "crioconservación" se refiere a la preservación de las células mediante enfriamiento a temperaturas bajo cero, tales como (típicamente) 77 K o -196ºC (el punto de ebullición del nitrógeno líquido). Los agentes crioprotectores a menudo se usan a temperaturas bajo cero para evitar que las células se conserven del daño debido a la congelación a bajas temperaturas o al calentamiento a temperatura ambiente. Los agentes crioconservadores y las velocidades de enfriamiento óptimas pueden proteger contra la lesión celular. Los agentes crioprotectores que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, dimetilsulfóxido (DMSO) (Lovelock and Bishop, Nature, 1959; 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, Nature, 1961; 190: 1204-1205), glicerol, polivinilpirrolidina (Rinfret, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1960; 85: 576), y polietilenglicol (Sloviter and Ravdin, Nature, 1962; 196: 48). La velocidad de enfriamiento preferida es de 1° a 3°C/minuto. Después de al menos dos horas, las células T han alcanzado una temperatura de -80ºC y pueden colocarse directamente en nitrógeno líquido (-196ºC) para su almacenamiento permanente, como en un recipiente de almacenamiento criogénico a largo plazo.

1. Células T

También se contempla la fabricación de composiciones mejoradas de células T CAR. Las células T utilizadas para la producción de células T CAR pueden ser autólogas/autogénicas ("propias") o no autólogas ("no propias", por ejemplo, alogénicas, singénicas o xenogénicas). Las células T pueden obtenerse de un sujeto mamífero. Las células T se obtienen de un sujeto primate. Las células T se obtienen de un sujeto humano.

Las células T se pueden obtener de varias fuentes que incluyen, pero no se limitan a, células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre del cordón umbilical, tejido de timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores. Las células T se pueden obtener de una unidad de sangre recolectada de un sujeto usando cualquier número de técnicas conocidas por la persona experta, como la sedimentación, por ejemplo, la separación FICOLL™. Las células de la sangre circulante de un individuo pueden obtenerse por aféresis. El producto de aféresis generalmente contiene linfocitos, que incluyen células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. Las células recogidas por aféresis pueden lavarse para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un regulador o medio apropiado para su posterior procesamiento. Las células se pueden lavar con PBS o con otra solución adecuada que carece de calcio, magnesio y la mayoría, si no todos los demás, cationes divalentes. Como apreciarían los expertos en la materia, una etapa de lavado puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como el uso de una centrífuga de flujo semiautomatizado. Por ejemplo, el procesador celular Cobe 2991, el Baxter CytoMate o similares. Después del lavado, las células se pueden resuspender en una variedad de reguladores biocompatibles u otra solución salina con o sin regulador. Los componentes indeseables de la muestra de aféresis pueden eliminarse en el medio de cultivo celular directamente resuspendido.

Una población de células que comprende células T, por ejemplo, PBMC, puede usarse en los métodos de fabricación contemplados en el presente documento. Puede usarse una población aislada o purificada de células T en los métodos de fabricación contemplados en el presente documento. Las células se pueden aislar de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) lisando los glóbulos rojos y agotando los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™. Después del aislamiento de PBMC, los linfocitos T citotóxicos y auxiliares pueden clasificarse en subpoblaciones de células T vírgenes, de memoria y efectoras, ya sea antes o después de la activación, expansión y/o modificación genética.

Una subpoblación específica de células T, que expresa uno o más de los siguientes marcadores: CD3, CD4, CD8, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62, CD 127 y HLA-DR puede aislarse adicionalmente mediante técnicas de selección positivas o negativas. Una subpoblación específica de células T, que expresa uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en i) CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197; o ii) CD38 o CD62L, CD127, CD197 y CD38, pueden aislarse adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. En diversas realizaciones, las composiciones de células T fabricadas no expresan o pueden no expresar sustancialmente uno o más de los siguientes marcadores: CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 y LAG3.

La expresión de uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD62L, CD127, CD197 y CD38 se incrementa al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces o más en comparación con una población de células T activadas y expandidas sin un inhibidor de PI3K.

La expresión de uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 y LAG3 disminuye al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces o más en comparación con una población de células T activadas y se expandió con un inhibidor de PI3K.

Los métodos de fabricación contemplados en el presente documento pueden aumentar el número de células T CAR que comprenden uno o más marcadores de células T ingenuas o de desarrollo potente. Sin desear limitarse a ninguna teoría en particular, los presentes inventores creen que el tratamiento de una población de células que comprenden células T con uno o más inhibidores de PI3K da como resultado un aumento de la expansión de las células T de desarrollo potente y proporciona una inmunoterapia de células T CAR adoptiva más robusta y eficaz en comparación con las terapias de células T CAR existentes.

Los ejemplos ilustrativos de marcadores de células T vírgenes o potentes para el desarrollo aumentadas en células T fabricadas usando los métodos contemplados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, CD62L, CD127, CD197 y CD38. Las células T ingenuas pueden no expresar o no expresar sustancialmente uno o más de los siguientes marcadores: CD57, CD244, CD160, PD-1, BTLA, CD45RA, CTLA4, TIM3 y LAG3.

Con respecto a las células T, las poblaciones de células T resultantes de las diversas metodologías de expansión contempladas en el presente documento pueden tener una variedad de propiedades fenotípicas específicas, dependiendo de las condiciones empleadas. Las poblaciones de células T expandidas comprenden uno o más de los siguientes marcadores fenotípicos: CD62L, CD127, CD197, CD38 y HLA-DR.

Tales marcadores fenotípicos pueden incluir una expresión mejorada de uno o más de, o todos, CD62L, CD127, CD197 y CD38. Los linfocitos T $CD8^+$ caracterizados por la expresión de marcadores fenotípicos de células T vírgenes que incluyen CD62L, CD127, CD197 y CD38 pueden expandirse.

Las células T caracterizadas por la expresión de marcadores fenotípicos de células T de memoria central que incluyen CD45RO, CD62L, CD127, CD197 y CD38 y negativas para la granzima B pueden expandirse. Las células T de memoria central pueden ser células T $CD45RO^+$, $CD62L^+$, $CD8^+$.

Los linfocitos T $CD4^+$ caracterizados por la expresión de marcadores fenotípicos de células $CD4^+$ vírgenes que incluyen CD62L y negativos para la expresión de CD45RA y/o CD45RO pueden expandirse. Las células $CD4^+$ caracterizadas por la expresión de marcadores fenotípicos de las células $CD4^+$ de memoria central pueden incluir CD62L y CD45RO positivo. Las células efectoras $CD4^+$ pueden ser CD62L positivas y CD45RO negativas.

Las células T pueden aislarse de un individuo y activarse y estimularse para que proliferen in vitro antes de ser modificadas genéticamente para expresar un CAR anti-BCMA. A este respecto, las células T pueden cultivarse antes y/o después de ser modificadas genéticamente (es decir, transducidas o transfectadas para expresar un CAR anti-BCMA contemplado aquí).

2. Activación y expansión

Para lograr dosis terapéuticas suficientes de composiciones de células T, las células T a menudo están sujetas a una o más rondas de estimulación, activación y/o expansión. Las células T pueden activarse y expandirse generalmente usando métodos como se describe, por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692.964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; y 6,867,041. Las células T modificadas para expresar un CAR anti-BCMA pueden activarse y expandirse antes y/o después de que las células T se modifiquen. Además, las células T pueden ponerse en contacto con uno o más agentes que modulan la vía de señalización de las células PI3K antes, durante y/o después de la activación y/o expansión. Las células T fabricadas por los métodos contemplados en el presente documento pueden experimentar una, dos, tres, cuatro o cinco o más rondas de activación y expansión, cada una de las cuales puede incluir uno o más agentes que modulan la ruta de señalización de las células PI3K.

Se puede presentar un ligando coestimulador en una célula presentadora de antígeno (por ejemplo, una aAPC, célula dendrítica, célula B y similares) que se une específicamente a una molécula coestimuladora asociada en una célula T, proporcionando así una señal que, además a la señal primaria proporcionada por, por ejemplo, la unión de un complejo TCR/CD3, media una respuesta de células T deseada. Los ligandos coestimuladores adecuados incluyen, pero no se limitan a, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulador inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor beta de linfotoxina, ILT3, ILT4, un agonista o anticuerpo que se une al receptor del ligando Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3.

Un ligando coestimulador comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a una molécula coestimuladora presente en una célula T, que incluye, pero no se limita a, CD27, CD28, 4-IBB, OX40, CD30, CD40, PD-1, 1COS, antígeno asociado a la función linfocitaria-1 (LFA-1), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83.

Los ligandos coestimuladores adecuados incluyen además antígenos diana, que pueden proporcionarse en forma soluble o expresarse en APC o aAPC que se unen a TCR o CAR expresados en células T modificadas.

Un método para fabricar células T contemplado en el presente documento puede comprender activar una población de células que comprende células T y expandir la población de células T. La activación de las células T se puede lograr proporcionando una señal de estimulación primaria a través del complejo TCR/CD3 de células T o mediante la estimulación de la proteína de superficie CD2 y proporcionando una señal de coestimulación secundaria a través de una molécula accesoria, por ejemplo, CD28.

El complejo TCR/CD3 se puede estimular poniendo en contacto la célula T con un agente de unión a CD3 adecuado, por ejemplo, un ligando CD3 o un anticuerpo monoclonal anti-CD3. Ejemplos ilustrativos de anticuerpos CD3 incluyen, entre otros, OKT3, G19-4, BC3 y 64.1.

Se puede usar un agente de unión a CD2 para proporcionar una señal de estimulación primaria a las células T. Ejemplos ilustrativos de agentes de unión a CD2 incluyen, pero no se limitan a, ligandos de CD2 y anticuerpos anti-CD2, por ejemplo, el anticuerpo T11.3 en combinación con el anticuerpo T11.1 o T11.2 (Meuer, S.C. et al. (1984) Cell 36: 897-906) y el anticuerpo 9.6 (que reconoce el mismo epítopo que TI 1.1) en combinación con el anticuerpo 9-1 (Yang, S.Y. et al. (1986) J. Immunol. 137: 1097-1100). También se pueden usar otros anticuerpos que se unen a los mismos epítopos que cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente. Los anticuerpos adicionales, o combinaciones de anticuerpos, pueden prepararse e identificarse mediante técnicas estándar como se describe en otra parte del presente documento.

Además de la señal de estimulación primaria proporcionada a través del complejo TCR/CD3, o mediante CD2, la inducción de respuestas de células T requiere una segunda señal coestimuladora. Se puede usar un agente de unión a CD28 para proporcionar una señal coestimuladora. Ejemplos ilustrativos de agentes de unión a CD28 incluyen, pero no se limitan a: ligandos naturales de CD28, por ejemplo, un ligando natural para CD28 (por ejemplo, un miembro de la familia de proteínas B7, como B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86); y anticuerpo monoclonal anti-CD28 o fragmento del mismo capaz de entrecruzar la molécula de CD28, por ejemplo, anticuerpos monoclonales 9.3, B-T3, XR-CD28, KOLT-2, 15E8, 248.23.2 y EX5.3D10.

La molécula que proporciona la señal de estimulación primaria, por ejemplo, una molécula que proporciona estimulación a través del complejo TCR/CD3 o CD2, y la molécula coestimuladora puede estar acoplada a la misma superficie.

Los agentes de unión que proporcionan señales estimuladoras y coestimuladoras pueden localizarse en la superficie de una célula. Esto se puede lograr transfectando o transduciendo una célula con un ácido nucleico que codifica el agente de unión en una forma adecuada para su expresión en la superficie celular o, alternativamente, acoplando un agente de unión a la superficie celular.

La molécula que proporciona la señal de estimulación primaria, por ejemplo, una molécula que proporciona estimulación a través del complejo TCR/CD3 o CD2, y la molécula coestimuladora puede mostrarse en células presentadoras de antígeno.

En una realización, la molécula que proporciona la señal de estimulación primaria, por ejemplo, una molécula que proporciona estimulación a través del complejo TCR/CD3 o CD2, y la molécula coestimuladora puede proporcionarse en superficies separadas.

Uno de los agentes de unión que proporcionan señales estimuladoras y coestimuladoras puede ser soluble (proporcionado en solución) y el otro agente(s) se proporciona en una o más superficies.

Los agentes aglutinantes que proporcionan señales estimuladoras y coestimuladoras pueden proporcionarse en forma soluble (en solución).

Los métodos para fabricar células T contemplados en el presente documento pueden comprender la activación de células T con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28.

Las composiciones de células T fabricadas por los métodos contemplados en el presente documento comprenden células T activadas y/o expandidas en presencia de uno o más agentes que inhiben una ruta de señalización de células PI3K. Las células T modificadas para expresar un CAR anti-BCMA pueden activarse y expandirse antes y/o después de que las células T se modifiquen. Una población de células T puede activarse, modificarse para expresar un CAR anti-BCMA y luego cultivarse para expansión.

Las células T fabricadas por los métodos contemplados en el presente documento pueden comprender un mayor número de células T que expresan marcadores indicativos de un alto potencial proliferativo y la capacidad de autorrenovarse, pero que no expresan o expresan marcadores sustancialmente indetectables de diferenciación de células T. Estas células T pueden activarse y expandirse repetidamente de manera robusta y, por lo tanto, proporcionan una composición terapéutica mejorada de células T.

Una población de células T activadas y expandidas en presencia de uno o más agentes que inhiben una ruta de señalización de células PI3K puede expandirse al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, a al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 250 veces, al menos al menos 500 veces, al menos 1000 veces o más en comparación con una población de células T activadas y expandidas sin un inhibidor de PI3K.

Una población de células T caracterizada por la expresión de marcadores de células T jóvenes puede activarse y expandirse en presencia de uno o más agentes que inhiben una ruta de señalización de células PI3K y pueden expandirse al menos 1.5 veces, al menos 2 veces , al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces , al menos 100 veces, al menos 250 veces, al menos 500 veces, al menos 1000 veces o más en comparación con la población de células T activadas y expandidas sin un inhibidor de PI3K.

Las células T en expansión activadas por los métodos contemplados en el presente documento pueden comprender además cultivar una población de células que comprenden células T durante varias horas (aproximadamente 3 horas) a aproximadamente 7 días a aproximadamente 28 días o cualquier valor entero por hora entre ellos. La composición de células T puede cultivarse durante 14 días. Las células T pueden cultivarse durante aproximadamente 21 días. Las composiciones de células T pueden cultivarse durante aproximadamente 2-3 días. También pueden desearse varios ciclos de estimulación/activación/expansión de modo que el tiempo de cultivo de las células T pueda ser de 60 días o más.

Las condiciones apropiadas para el cultivo de células T pueden incluir un medio apropiado (por ejemplo, Medio Mínimo Esencial o Medio RPMI 1640 o, X-vivo 15, (Lonza)) y uno o más factores necesarios para la proliferación y la viabilidad que incluyen, pero no están limitados al suero (por ejemplo, suero fetal bovino o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN-γ, IL-4, IL-7, IL-21, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGFβ y TNF-α o cualquier otro aditivo adecuado para el crecimiento de células conocido por el experto en la materia.

Otros ejemplos ilustrativos de medios de cultivo celular incluyen, entre otros, RPMI 1640, Clicks, AIM-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, libres de suero o suplementados con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citoquina(s) suficiente para el crecimiento y expansión de las células T.

Los ejemplos ilustrativos de otros aditivos para la expansión de células T incluyen, pero no se limitan a, tensioactivo, piasmanate, reguladores de pH como HEPES y agentes reductores como N-acetilcisteína y 2-mercaptoetanol.

Los antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomicina, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se infunden en un sujeto. Las células objetivo se mantienen en condiciones necesarias para soportar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura apropiada (por ejemplo, 37°C) y una atmósfera (por ejemplo, aire más 5% de $CO_2$).

Las PBMC o las células T aisladas pueden ponerse en contacto con un agente estimulante y un agente coestimulador, como los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, generalmente unidos a una perla u otra superficie, en un medio de cultivo con citoquinas apropiadas, como IL-2, IL-7 y/o IL-15.

APC artificial (aAPC) fabricado mediante manipulación de células K562, U937, 721.221, T2 y C1R para dirigir la expresión y secreción estables, de una variedad de moléculas coestimuladoras y citoquinas. Las aAPC K32 o U32 se pueden usar para dirigir la visualización de una o más moléculas estimuladoras basadas en anticuerpos en la superficie de la célula AAPC. Las poblaciones de células T pueden expandirse mediante aAPC que expresan una variedad de moléculas coestimuladoras que incluyen, entre otras, CD137L (4-1BBL), CD134L (OX40L) y/o CD80 o CD86. Finalmente, las aAPC proporcionan una plataforma eficiente para expandir las células T genéticamente modificadas y para mantener la expresión de CD28 en las células T CD8. aAPCs proporcionadas en WO 03/057171 y US2003/0147869.

3. Agentes

Se proporciona un método para fabricar células T que expande las células T indiferenciadas o potentes para el desarrollo que comprenden poner en contacto las células T con un agente que modula una ruta PI3K en las células. Se proporciona un método para fabricar células T que expande las células T indiferenciadas o de desarrollo potente que comprenden poner en contacto las células T con un agente que modula una vía PI3K/AKT/mTOR en las células. Se puede contactar a las células antes, durante y/o después de la activación y expansión. Las composiciones de

células T retienen una potencia de células T suficiente para que puedan experimentar múltiples rondas de expansión sin un aumento sustancial en la diferenciación.

Como se usa en el presente documento, los términos "modular", "modulador" o "agente modulador" o término comparable se refieren a la capacidad de un agente para provocar un cambio en una ruta de señalización celular. Un modulador puede aumentar o disminuir una cantidad, actividad de un componente de ruta o aumentar o disminuir un efecto deseado o salida de una ruta de señalización celular. El modulador puede ser un inhibidor. El modulador es un activador.

Un "agente" se refiere a un compuesto, molécula pequeña, por ejemplo, molécula orgánica pequeña, ácido nucleico, polipéptido o un fragmento, isoforma, variante, análogo o derivado del mismo utilizado en la modulación de un PI3K/AKT/mTOR ruta.

Una "molécula pequeña" se refiere a una composición que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 5 kD, menos de aproximadamente 4 kD, menos de aproximadamente 3 kD, menos de aproximadamente 2 kD, menos de aproximadamente 1 kD o menos que alrededor de 5 kD. Las moléculas pequeñas pueden comprender ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, peptoides, carbohidratos, lípidos, componentes de los mismos u otras moléculas orgánicas o inorgánicas. Bibliotecas de productos químicos y/o biológicos. Las mezclas, como los extractos de hongos, bacterias o algas, son conocidas en la técnica y pueden seleccionarse con cualquiera de los ensayos. Se pueden encontrar ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares en: (Carell et al., 1994a; Carell et al., 1994b; Cho et al., 1993; DeWitt et al., 1993; Gallop et al., 1994; Zuckermann et al, 1994).

Un "análogo" se refiere a un pequeño compuesto orgánico, un nucleótido, una proteína o un polipéptido que posee actividad o funciones similares o idénticas que el compuesto, nucleótido, proteína o polipéptido o compuesto que tiene la actividad deseada pero no es necesario que comprenda una secuencia o estructura que sea similar o idéntica a la secuencia o estructura de la realización preferida.

Un "derivado" se refiere a un compuesto, una proteína o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína o polipéptido original que ha sido alterado por la introducción de sustituciones, eliminaciones o adiciones de residuos de aminoácidos, o un ácido nucleico o nucleótido que se ha modificado mediante la introducción de sustituciones o eliminaciones, adiciones o mutaciones de nucleótidos. El ácido nucleico, nucleótido, proteína o polipéptido derivado posee una función similar o idéntica al polipéptido original.

El agente que modula una ruta PI3K puede activar un componente de la ruta. Un "activador" o "agonista" se refiere a un agente que promueve, aumenta o induce una o más actividades de una molécula en una vía PI3K/AKT/mTOR que incluye, sin limitación, una molécula que inhibe una o más actividades de un PI3K.

El agente que modula una ruta PI3K puede inhibir un componente de la ruta. Un "inhibidor" o "antagonista" se refiere a un agente que inhibe, disminuye o reduce una o más actividades de una molécula en una ruta PI3K que incluye, sin limitación, un PI3K. El inhibidor puede ser un inhibidor de doble molécula. El inhibidor puede inhibir una clase de moléculas que tienen las mismas actividades o actividades sustancialmente similares (un paninhibidor) o puede inhibir específicamente la actividad de una molécula (un inhibidor selectivo o específico). La inhibición también puede ser irreversible o reversible.

El inhibidor puede tener una $IC_{50}$ de al menos 1 nM, al menos 2 nM, al menos 5 nM, al menos 10 nM, al menos 50 nM, al menos 100 nM, al menos 200 nM, al menos 500 nM, al menos 1 µM, al menos 10 µM, al menos 50 µM, o al menos 100 µM. Las determinaciones de $IC_{50}$ se pueden lograr usando cualquier técnica convencional conocida en la técnica. Por ejemplo, se puede determinar una $IC_{50}$ midiendo la actividad de una enzima dada en presencia de un rango de concentraciones del inhibidor en estudio. Los valores de actividad enzimática obtenidos experimentalmente se grafican contra las concentraciones de inhibidor utilizadas. La concentración del inhibidor que muestra un 50% de actividad enzimática (en comparación con la actividad en ausencia de cualquier inhibidor) se toma como el valor "$IC_{50}$". Análogamente, se pueden definir otras concentraciones inhibitorias a través de determinaciones apropiadas de actividad.

Las células T pueden ponerse en contacto o tratarse o cultivarse con uno o más moduladores de una ruta de PI3K a una concentración de al menos 1 nM, al menos 2 nM, al menos 5 nM, al menos 10 nM, al menos 50 nM, al menos 100 nM, a al menos 200 nM, al menos 500 nM, al menos 1 µM, al menos 10 µM, al menos 50 µM, al menos 100 µM o al menos 1 M.

Las células T pueden ponerse en contacto o tratarse o cultivarse con uno o más moduladores de una ruta PI3K durante al menos 12 horas, 18 horas, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, al menos 2 semanas, al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses o más con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más rondas de expansión.

a. Ruta PI3K/Akt/mTOR

La diana de fosfatidil-inositol-3 quinasa/Akt/mamífero de la ruta de rapamicina sirve como un conducto para integrar la señalización del factor de crecimiento con la proliferación celular, la diferenciación, el metabolismo y la supervivencia. Las PI3K son una familia de lípidos quinasas intracelulares altamente conservadas. Las PI3K de clase

IA se activan mediante tirosina quinasas receptoras del factor de crecimiento (RTK), ya sea directamente o mediante la interacción con la familia de moléculas adaptadoras del sustrato receptor de insulina. Esta actividad da como resultado la producción de fosfatidil-inositol-3,4,5-trisfosfato (PIP3), un regulador de la serina/treonina quinasa Akt. mTOR actúa a través de la ruta canónica PI3K a través de 2 complejos distintos, cada uno caracterizado por diferentes parejas de unión que confieren actividades distintas. mTORC1 (mTOR en complejo con PRAS40, raptor y mLST8/GbL) actúa como un efector corriente abajo de la señalización de PI3K/Akt, vinculando las señales del factor de crecimiento con la traducción de proteínas, el crecimiento celular, la proliferación y la supervivencia. mTORC2 (mTOR en complejo con rictor, mSIN1, protor y mLST8) actúa como un activador aguas arriba de Akt.

Tras la activación mediada por el receptor del factor de crecimiento de PI3K, Akt es reclutado a la membrana a través de la interacción de su dominio de homología de pleckstrina con PIP3, exponiendo así su bucle de activación y permitiendo la fosforilación en treonina 308 (Thr308) por la proteína quinasa dependiente de fosfoinositida constitutivamente activa. 1 (PDK1). Para la activación máxima, Akt también se fosforila por mTORC2, en la serina 473 (Ser473) de su motivo hidrófobo C-terminal. También se ha demostrado que DNA-PK y HSP son importantes en la regulación de la actividad de Akt. Akt activa mTORC1 a través de la fosforilación inhibitoria de TSC2, que junto con TSC1, regula negativamente mTORC1 al inhibir la Rheb GTPasa, un regulador positivo de mTORC1. mTORC1 tiene 2 sustratos bien definidos, p70S6K (denominado en lo sucesivo S6K1) y 4E-BP1, los cuales regulan críticamente la síntesis de proteínas. Por lo tanto, mTORC1 es un importante efector corriente abajo de PI3K, que vincula la señalización del factor de crecimiento con la traducción de proteínas y la proliferación celular.

b. Inhibidores de PI3K

Como se usa en el presente documento, el término "inhibidor de PI3K" se refiere a un ácido nucleico, péptido, compuesto o molécula orgánica pequeña que se une e inhibe al menos una actividad de PI3K. Las proteínas PI3K se pueden dividir en tres clases, PI3K de clase 1, PI3K de clase 2 y PI3K de clase 3. Las PI3K de clase 1 existen como heterodímeros que consisten en una de cuatro subunidades catalíticas p110 (p110α, p110β, p110δ y p110γ) y una de las dos familias de subunidades reguladoras. Un inhibidor de PI3K se dirige preferiblemente a los inhibidores de PI3K de clase 1. Un inhibidor de PI3K puede mostrar selectividad para una o más isoformas de los inhibidores de PI3K de clase 1 (es decir, selectividad para p110α, p110β, p110δ y p110γ o uno o más de p110α, p110β, p110δ y p110γ). Un inhibidor de PI3K puede no mostrar selectividad de isoforma y ser considerado un "inhibidor de pan-PI3K". Un inhibidor de PI3K puede competir por unirse con ATP al dominio catalítico de PI3K.

Un inhibidor de PI3K puede, por ejemplo, apuntar a PI3K así como a proteínas adicionales en la ruta PI3K-AKT-mTOR. Un inhibidor de PI3K puede dirigirse tanto a mTOR como a PI3K y puede denominarse inhibidor de mTOR o inhibidor de PI3K. Un inhibidor de PI3K que solo se dirige a PI3K puede denominarse inhibidor selectivo de PI3K. Se puede entender que un inhibidor selectivo de PI3K se refiere a un agente que exhibe una concentración inhibitoria del 50% con respecto a PI3K que es al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 50 veces, a al menos 100 veces, al menos 1000 veces o más, por debajo de la $IC_{50}$ del inhibidor con respecto a mTOR y/u otras proteínas en la ruta.

Los inhibidores de ejemplo de PI3K pueden inhibir PI3K con una $IC_{50}$ (concentración que inhibe el 50% de la actividad) de aproximadamente 200 nM o menos, preferiblemente aproximadamente 100 nm o menos, incluso más preferiblemente aproximadamente 60 nM o menos, aproximadamente 25 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 1 nM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 1 µM o menos. Un inhibidor de PI3K puede inhibir PI3K con una $IC_{50}$ de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 100 nm, más preferiblemente de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 50 nM, incluso más preferiblemente de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 15 nM.

Ejemplos ilustrativos de inhibidores de PI3K adecuados para usar en los métodos de fabricación de células T contemplados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, BKM120 (inhibidor de PI3K de clase 1, Novartis), XL147 (inhibidor de PI3K de clase 1, Exelixis), (pan-Inhibidor de PI3K, GlaxoSmithKline) y PX-866 (inhibidor de clase 1 PI3K; isoformas p110α, p110β y p110γ, Oncothyreon).

Otros ejemplos ilustrativos de inhibidores selectivos de PI3K incluyen, pero no se limitan a BYL719, GSK2636771, TGX-221, AS25242, CAL-101, ZSTK474 e IPI-145.

Otros ejemplos ilustrativos de inhibidores de pan-PI3K incluyen, entre otros, BEZ235, LY294002, GSK1059615, TG100713 y GDC-0941.

c. Inhibidores de AKT

Como se usa en el presente documento, el término "inhibidor de AKT" se refiere a un ácido nucleico, péptido, compuesto o molécula orgánica pequeña que inhibe al menos una actividad de AKT. Los inhibidores de AKT se pueden agrupar en varias clases, incluidos los inhibidores basados en lípidos (por ejemplo, inhibidores que se dirigen al dominio de homología de pleckstrina de AKT que evita que AKT se localice en las membranas plasmáticas), inhibidores competitivos de ATP e inhibidores alostéricos. Los inhibidores de AKT pueden actuar uniéndose al sitio catalítico de AKT. Los inhibidores de Akt pueden actuar inhibiendo la fosforilación de objetivos AKT posteriores, como mTOR. La

actividad de AKT puede inhibirse inhibiendo las señales de entrada para activar Akt inhibiendo, por ejemplo, la activación de ADN-PK de AKT, la activación de PDK-1 de AKT y/o la activación de mTORC2 de Akt.

Los inhibidores de AKT pueden dirigirse a las tres isoformas de AKT, AKT1, AKT2, AKT3 o pueden ser selectivas de isoformas y atacar solo una o dos de las isoformas de AKT. Un inhibidor de AKT puede apuntar a AKT así como a proteínas adicionales en la vía PI3K-AKT-mTOR. Un inhibidor de AKT que solo se dirige a AKT se puede denominar inhibidor de AKT selectivo. Se puede entender que un inhibidor selectivo de AKT se refiere a un agente que exhibe una concentración inhibitoria del 50% con respecto a AKT que es al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 50 veces, a al menos 100 veces, al menos 1000 veces o más por debajo de la $IC_{50}$ del inhibidor con respecto a otras proteínas en la vía.

Los inhibidores de ejemplo de AKT pueden inhibir AKT con una $IC_{50}$ (concentración que inhibe el 50% de la actividad) de aproximadamente 200 nM o menos, preferiblemente aproximadamente 100 nm o menos, incluso más preferiblemente aproximadamente 60 nM o menos, aproximadamente 25 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 1 nM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 1 µM o menos. Un AKT puede inhibir AKT con una $IC_{50}$ de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 100 nm, más preferiblemente de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 50 nM, incluso más preferiblemente de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 15 nM.

Ejemplos ilustrativos de inhibidores de AKT para uso en combinación con conjugados de anticuerpo-fármaco basados en auristatina incluyen, por ejemplo, perifosina (Keryx), MK2206 (Merck), VQD-002 (VioQuest), XL418 (Exelixis), GSK690693, GDC- 0068 y PX316 (PROLX Pharmaceuticals).

Un ejemplo ilustrativo, no limitativo de un inhibidor selectivo de Akt1 es A-674563.

Un ejemplo ilustrativo, no limitativo, de un inhibidor selectivo de Akt2 es CCT128930.

La activación del ADN-PK del inhibidor de Akt de Akt, la activación de PDK-1 de Akt, la activación de mTORC2 de Akt o la activación de HSP de Akt.

Los ejemplos ilustrativos de inhibidores de ADN-PK incluyen, pero sin limitación, NU7441, PI-103, NU7026, PIK-75 y PP-121.

d. Inhibidores de mTOR

Los términos "inhibidor de mTOR" o "agente que inhibe mTOR" se refieren a un ácido nucleico, péptido, compuesto o molécula orgánica pequeña que inhibe al menos una actividad de una proteína mTOR, como, por ejemplo, la serina/actividad de la treonina proteína quinasa en al menos uno de sus sustratos (por ejemplo, p70S6 quinasa 1, 4E-BP1, AKT/PKB y eEF2). Los inhibidores de mTOR pueden unirse e inhibir directamente mTORC1, mTORC2 o ambos mTORC1 y mTORC2.

La inhibición de la actividad mTORC1 y/o mTORC2 se puede determinar mediante una reducción en la transducción de señales de la ruta PI3K/Akt/mTOR. Se puede utilizar una amplia variedad de lecturas para establecer una reducción de la salida de dicha vía de señalización. Algunas lecturas de ejemplo no limitativas incluyen (1) una disminución en la fosforilación de Akt en los residuos, que incluyen pero no se limitan a 5473 y T308; (2) una disminución en la activación de Akt como se evidencia, por ejemplo, por una reducción de la fosforilación de sustratos de Akt que incluyen, pero no se limitan a Fox01/O3a T24/32, GSK3a/β; S21/9 y TSC2 T1462; (3) una disminución en la fosforilación de las moléculas de señalización corriente abajo de mTOR, que incluye pero no se limita a ribosómica S6 S240/244, 70S6K T389 y 4EBP1 T37/46; y (4) inhibición de la proliferación de células cancerosas. Los inhibidores de mTOR pueden ser inhibidores del sitio activo. Estos son inhibidores de mTOR que se unen al sitio de unión a ATP (también denominado bolsillo de unión a ATP) de mTOR e inhiben la actividad catalítica de mTORC1 y mTORC2. Una clase de inhibidores del sitio activo adecuados para su uso en los métodos de fabricación de células T contemplados en el presente documento son los inhibidores de especificidad dual que se dirigen e inhiben directamente tanto PI3K como mTOR. Los inhibidores de especificidad dual se unen tanto al sitio de unión a ATP de mTOR como a PI3K. Ejemplos ilustrativos de tales inhibidores incluyen, pero no se limitan a: imidazoquinazolinas, wortmannina, LY294002, PI-103 (Cayman Chemical), SF1126 (Semafore), BGT226 (Novartis), XL765 (Exelixis) y NVP-BEZ235 (Novartis).

Otra clase de inhibidores del sitio activo de mTOR adecuados para su uso en los métodos contemplados en el presente documento inhiben selectivamente la actividad de mTORC1 y mTORC2 en relación con una o más fosfatidilinositol 3-quinasas de tipo I, por ejemplo, PI3 quinasa α, β, γ o δ. Estos inhibidores del sitio activo se unen al sitio activo de mTOR pero no a PI3K. Ejemplos ilustrativos de tales inhibidores incluyen, entre otros: pirazolopirimidinas, Torin1 (Guertin and Sabatini), PP242 (2-(4-Amino-1-isopropil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-ilo)-1H-indol-5-ol), PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth) y AZD8055 (Liu et al., Nature Review, 8, 627-644,2009).

Un inhibidor selectivo de mTOR se refiere a un agente que presenta una concentración inhibitoria del 50% ($IC_{50}$) con respecto a mTORC1 y/o mTORC2, que es al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces o más, más bajo que la $IC_{50}$ del inhibidor con respecto a una, dos, tres o más PI3-quinasas tipo I o a todas las PI3-quinasas tipo I.

Otra clase de inhibidores de mTOR contemplados se denominan en el presente documento "rapalogs". Como se usa en el presente documento, el término "rapalogs" se refiere a compuestos que se unen específicamente al dominio mTOR FRB (dominio de unión a rapamicina FKBP), están estructuralmente relacionados con la rapamicina y retienen las propiedades inhibidoras de mTOR. El término rapalogs excluye la rapamicina. Los rapalogs incluyen ésteres, éteres, oximas, hidrazonas e hidroxilaminas de rapamicina, así como compuestos en los que los grupos funcionales en la estructura del núcleo de rapamicina se han modificado, por ejemplo, por reducción u oxidación. Las sales farmacéuticamente aceptables de tales compuestos también se consideran derivados de rapamicina. Ejemplos ilustrativos de rapalogs adecuados para usar en los métodos contemplados en el presente documento incluyen, sin limitación, temsirolimus (CC1779), everolimus (RAD001), deforolimus (AP23573), AZD8055 (AstraZeneca) y OSI-027 (OSI). El agente puede ser el inhibidor de mTOR rapamicina (sirolimus).

Los inhibidores de mTOR de ejemplo para su uso pueden inhibir mTORC1, mTORC2 o mTORC1 y mTORC2 con una $IC_{50}$ (concentración que inhibe el 50% de la actividad) de aproximadamente 200 nM o menos, preferiblemente aproximadamente 100 nm o menos, incluso más preferiblemente aproximadamente 60 nM o menos, aproximadamente 25 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 1 nM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 1 µM o menos. Un inhibidor de mTOR para uso inhibe mTORC1, mTORC2 o ambos mTORC1 y mTORC2 con una $IC_{50}$ de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 100 nm, más preferiblemente de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 50 nM, incluso más preferiblemente de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 15 nM.

Los inhibidores de ejemplo de mTOR pueden inhibir PI3K y mTORC1 o mTORC2 o mTORC1 y mTORC2 y PI3K con una $IC_{50}$ (concentración que inhibe el 50% de la actividad) de aproximadamente 200 nM o menos, preferiblemente aproximadamente 100 nm o menos, incluso más preferiblemente aproximadamente 60 nM o menos, aproximadamente 25 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 1 nM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 1 µM o menos. Un inhibidor de mTOR para uso puede inhibir PI3K y mTORC1 o mTORC2 o ambos mTORC1 y mTORC2 y PI3K con un $IC_{50}$ de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 100 nm, más preferiblemente de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 50 nM, incluso más preferiblemente de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 15 nM.

Otros ejemplos ilustrativos de inhibidores de mTOR adecuados para el uso contemplado en el presente documento incluyen, pero no se limitan a AZD8055, INK128, rapamicina, PF-04691502 y everolimus.

Se ha demostrado que mTOR demuestra una actividad catalítica robusta y específica hacia las proteínas fisiológicas del sustrato, la proteína quinasa ribosómica I (p70S6K1) y la proteína de unión a eIF4E 1 (4EBP1) medida por anticuerpos específicos de fósforo en transferencia Western.

El inhibidor de la ruta PI3K/AKT/mTOR puede ser un inhibidor de la quinasa s6 seleccionado del grupo que consiste en: BI-D1870, H89, PF-4708671, FMK y AT7867.

I. Composiciones y formulaciones

Las composiciones contempladas en el presente documento pueden comprender uno o más polipéptidos, polinucleótidos, vectores que comprenden las mismas células efectoras inmunes modificadas genéticamente, etc., como se contempla en el presente documento. Las composiciones incluyen, entre otras, composiciones farmacéuticas. Una "composición farmacéutica" se refiere a una composición formulada en soluciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables para la administración a una célula o un animal, solo o en combinación con una o más de otras modalidades de terapia. También se entenderá que, si se desea, las composiciones pueden administrarse en combinación con otros agentes también, tales como, por ejemplo, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, moléculas pequeñas, quimioterapéuticos, profármacos, fármacos, anticuerpos u otros diversos agentes farmacéuticamente activos. Prácticamente no hay límite para otros componentes que también pueden incluirse en las composiciones, siempre que los agentes adicionales no afecten negativamente a la capacidad de la composición para administrar la terapia prevista.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuados para usar en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.

Como se usa en el presente documento, "vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye, sin limitación, cualquier adyuvante, vehículo, excipiente, deslizante, agente edulcorante, diluyente, conservante, tinte/colorante, potenciador del sabor, tensioactivo, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, estabilizador, agente isotónico, solvente, tensioactivo o emulsionante que ha sido aprobado por la United States Food and Drug Administration como aceptable para uso en humanos o animales domésticos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables de ejemplo incluyen, pero sin limitación, azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto; malta; gelatina; talco; manteca de cacao, ceras, grasas animales y vegetales, parafinas, siliconas, bentonitas, ácido silícico, óxido de zinc; aceites, tales como aceite de maní, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol;

ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar agentes reguladores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; la solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones regulador de fosfato; y cualquier otra sustancia compatible empleada en formulaciones farmacéuticas.

En realizaciones particulares, las composiciones comprenden una cantidad de células efectoras inmunitarias que expresan CAR contempladas en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "cantidad" se refiere a "una efectiva cantidad " o "una cantidad efectiva" de una célula terapéutica modificada genéticamente, por ejemplo, una célula T, para lograr un resultado profiláctico o terapéutico beneficioso o deseado, incluyendo resultados clínicos.

Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad de una célula terapéutica modificada genéticamente eficaz para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente pero no necesariamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva es menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de una célula terapéutica modificada genéticamente puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de las células madre y progenitoras para obtener una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es aquella en donde los efectos terapéuticamente beneficiosos compensan los efectos tóxicos o perjudiciales del virus o las células terapéuticas transducidas. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" incluye una cantidad que es efectiva para "tratar" a un sujeto (por ejemplo, un paciente). Cuando se indica una cantidad terapéutica, la cantidad precisa de las composiciones a administrar puede ser determinada por un médico teniendo en cuenta las diferencias individuales en edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis y el estado del paciente (sujeto). En general, se puede afirmar que una composición farmacéutica que comprende las células T descritas en el presente documento se puede administrar a una dosis de $10^2$ a $10^{10}$ células/kg de peso corporal, preferiblemente de $10^5$ a $10^6$ células/kg de peso corporal, incluidos todos los valores enteros dentro de esos intervalos. El número de células dependerá del uso final para el que está destinada la composición, al igual que el tipo de células incluidas en el mismo. Para los usos proporcionados en el presente documento, las células están generalmente en un volumen de un litro o menos, pueden ser de 500 ml o menos, incluso de 250 ml o 100 ml o menos. Por lo tanto, la densidad de las células deseadas es típicamente mayor que $10^6$ células/ml y generalmente es mayor que $10^7$ células/ml, generalmente $10^8$ células/ml o más. El número clínicamente relevante de células inmunes se puede distribuir en múltiples infusiones que acumulativamente igualan o exceden $10^5$, $10^6$, $10^7$, $10^8$, $10^9$, $10^{10}$, $10^{11}$ o $10^{12}$ células. Particularmente, dado que todas las células infundidas se redirigirán a un antígeno diana particular (por ejemplo, cadena liviana κ o λ), se pueden administrar números menores de células, en el rango de $10^6$/kilogramo ($10^6$-$10^{11}$ por paciente). Las composiciones celulares que expresan CAR pueden administrarse múltiples veces a dosis dentro de estos intervalos. Las células pueden ser alogénicas, singénicas, xenogénicas o autólogas para el paciente sometido a terapia. Si se desea, el tratamiento también puede incluir la administración de mitógenos (por ejemplo, PHA) o linfocinas, citoquinas y/o quimioquinas (por ejemplo, IFN-γ, IL-2, IL-12, TNF-alfa, IL-18 y TNF-beta, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1α, etc.) como se describe aquí para mejorar la inducción de la respuesta inmune.

Generalmente, las composiciones que comprenden las células activadas y expandidas como se describe en el presente documento pueden utilizarse en el tratamiento y la prevención de enfermedades que surgen en individuos inmunocomprometidos. En particular, las composiciones que comprenden las células T modificadas con CAR contempladas en el presente documento se usan en el tratamiento de tumores malignos de células B. Las células T modificadas con CAR pueden administrarse solas o como una composición farmacéutica en combinación con vehículos, diluyentes, excipientes y/o con otros componentes como IL-2 u otras citoquinas o poblaciones celulares. Las composiciones farmacéuticas contempladas en el presente documento comprenden una cantidad de células T genéticamente modificadas, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden una población de células efectoras inmunes que expresan CAR, tales como células T, pueden comprender reguladores tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente invención se formulan preferiblemente para administración parenteral, por ejemplo, administración intravascular (intravenosa o intraarterial), intraperitoneal o intramuscular.

Las composiciones farmacéuticas líquidas, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, pueden incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferiblemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; reguladores como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación

parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico. Una composición farmacéutica inyectable es preferiblemente estéril.

Las composiciones contempladas en el presente documento comprenden una cantidad eficaz de células efectoras inmunes que expresan CAR, solas o en combinación con uno o más agentes terapéuticos. Por lo tanto, las composiciones de células efectoras inmunes que expresan CAR pueden administrarse solas o en combinación con otros tratamientos contra el cáncer conocidos, tales como radioterapia, quimioterapia, trasplante, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia fotodinámica, etc. Las composiciones también pueden administrarse en combinación con antibióticos. Dichos agentes terapéuticos pueden aceptarse en la técnica como un tratamiento estándar para un estado de enfermedad particular como se describe aquí, tal como un cáncer particular. Ejemplos de agentes terapéuticos contemplados incluyen citoquinas, factores de crecimiento, esteroides, AINE, DMARD, antiinflamatorios, quimioterapéuticos, radioterapéuticos, anticuerpos terapéuticos u otros agentes activos y auxiliares.

Las composiciones que comprenden células efectoras inmunes que expresan CAR descritas en el presente documento pueden administrarse junto con cualquier número de agentes quimioterapéuticos. Ejemplos ilustrativos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); alquil sulfonatos tales como busulfano, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, que incluyen altretamina, trietilenomelamina, trietilenfosforamida, trietilentofosforamida y trimetilolomelamina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina, epirrubicina, esorrubicina, idarrubicina , marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glucósido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elformitina; acetato de elliptinio; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinan, lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; phenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazina; PSK®; razoxano; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rohne-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucil; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorrelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); derivados del ácido retinoico como Targretin™ (bexaroteno), Panretin™ (alitretinoína); ONTAK™ (denileukin diftitox); esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición los agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre cánceres tales como antiestrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, inhibidores de la aromatasa 4(5)-imidazoles, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Se pueden usar una variedad de otros agentes terapéuticos junto con las composiciones descritas en el presente documento. La composición que comprende células efectoras inmunes que expresan CAR puede administrarse con un agente antiinflamatorio. Los agentes o medicamentos antiinflamatorios incluyen, entre otros, esteroides y glucocorticoides (incluyendo betametasona, budesonida, dexametasona, acetato de hidrocortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona), medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) incluyen aspirina, ibuprofeno, naproxeno, metotrexato, sulfasalazina, leflunomida, medicamentos anti-TNF, ciclofosfamida y micofenolato.

Se eligen otros AINE de ejemplo del grupo que consiste en ibuprofeno, naproxeno, naproxeno sódico, inhibidores de Cox-2 tales como VIOXX® (rofecoxib) y CELEBREX® (celecoxib) y sialilatos. Los analgésicos de ejemplo se eligen del grupo que consiste en acetaminofeno, oxicodona, tramadol de hidrocloruro de proporxifeno. Los glucocorticoides de ejemplo se eligen del grupo que consiste en cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona o prednisona. Los modificadores de respuesta biológica de ejemplo incluyen moléculas dirigidas contra marcadores de la superficie celular (por ejemplo, CD4, CD5, etc.), inhibidores de citoquinas, como los antagonistas del TNF (por ejemplo, Etanercept (ENBREL®), adalimumab (HUMIRA®) e infliximab (REMICADE®), inhibidores de la quimioquina e inhibidores de la molécula de adhesión. Los modificadores de la respuesta biológica incluyen anticuerpos monoclonales, así como formas recombinantes de moléculas. Los DMARD de ejemplo incluyen azatioprina,

ciclofosfamida, ciclosporina, metotrexato, penicilamina, leflunomida, sulfasalazina, hidroxicloroquina, Oro (oral (auranofina) e intramuscular) y minociclina.

Ejemplos ilustrativos de anticuerpos terapéuticos adecuados para la combinación con las células T modificadas con CAR contempladas en el presente documento, incluyen, pero no se limitan a, bavituximab, bevacizumab (avastin), bivatuzumab, blinatumomab, conatumumab, daratumumab, duligotumab, dacetuzumab, dalotuzumab, elotuzumab HuLuc63), gemtuzumab, ibritumomab, indatuximab, inotuzumab, lorvotuzumab, lucatumumab, milatuzumab, moxetumomab, ocaratuzumab, ofatumumab, rituximab, siltuximab, teprotumumab y ublituximab.

En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento se administran junto con una citoquina. Por "citoquina", como se usa en el presente documento, se entiende un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citoquinas son las linfoquinas, las monoquinas y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen las hormonas de crecimiento tales como la hormona de crecimiento humano, la hormona de crecimiento humana N-metionil y la hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina prorelaxina; hormonas glicoproteicas tales como la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora de mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento vascular endotelial; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso como NGF-beta; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina-I y -II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófagos-CSF (M-CSF); granulocitos-macrófagos-CSF (GM-CSF); y granulocitos-CSF (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, IL-21, un factor de necrosis tumoral como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores de polipéptidos que incluyen LIF y kit de ligando (KL). Como se usa en el presente documento, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante, y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

Una composición puede comprender células CAR T contempladas en el presente documento que se cultivan en presencia de un inhibidor de PI3K como se describe en el presente documento y expresan uno o más de los siguientes marcadores: CD3, CD4, CD8, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62, CD127, y HLA-DR puede aislarse aún más mediante técnicas de selección positiva o negativa. Una composición puede comprender una subpoblación específica de células T, que expresa uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197; y CD38 o CD62L, CD127, CD197 y CD38, se aíslan adicionalmente mediante técnicas de selección positivas o negativas. Las composiciones pueden no expresar o no expresar sustancialmente uno o más de los siguientes marcadores: CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 y LAG3.

La expresión de uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD62L, CD127, CD197 y CD38 aumenta al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces o más en comparación con una población de células T activadas y expandidas sin un inhibidor de PI3K.

La expresión de uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 y LAG3 disminuye al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, a al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces o más en comparación con una población de células T activadas y expandidas con un inhibidor de PI3K.

J. Métodos terapéuticos

Las células efectoras inmunes modificadas genéticamente contempladas en el presente documento proporcionan métodos mejorados de inmunoterapia adoptiva para su uso en el tratamiento de afecciones relacionadas con células B que incluyen, pero no se limitan a afecciones inmunorreguladoras y tumores malignos hematológicos.

La especificidad de una célula efectora inmunitaria primaria se puede redirigir a las células B modificando genéticamente la célula efectora inmunitaria primaria con un CAR contemplado en el presente documento. Se puede usar un vector viral para modificar genéticamente una célula efectora inmune con un polinucleótido particular que codifica un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno murino anti-BCMA que se une a un polipéptido BCMA; un dominio bisagra; un dominio transmembrana (TM), un enlazador oligo o polipéptido corto, que une el dominio TM al dominio de señalización intracelular del CAR; y uno o más dominios de señalización coestimuladores intracelulares; y un dominio de señalización primario.

También se describe un tipo de terapia celular en donde las células T se modifican genéticamente para expresar un CAR que se dirige a las células B que expresan BCMA. Las células T CAR anti-BCMA pueden cultivarse en presencia de IL-2 y un inhibidor de PI3K para aumentar las propiedades terapéuticas y la persistencia de las células T CAR. Las células T CAR se infunden luego a un receptor que lo necesita. La célula infundida puede matar la enfermedad que

causa las células B en el receptor. A diferencia de las terapias con anticuerpos, las células T CAR pueden replicarse in vivo, lo que resulta en una persistencia a largo plazo que puede conducir a una terapia sostenida contra el cáncer.

Las células T CAR pueden experimentar una fuerte expansión de células T in vivo y pueden persistir durante un período prolongado de tiempo. Las células T CAR pueden evolucionar hacia células T de memoria específica que pueden reactivarse para inhibir cualquier formación o crecimiento tumoral adicional.

Las composiciones que comprenden células efectoras inmunes que comprenden los CAR contemplados en el presente documento pueden usarse en el tratamiento de afecciones asociadas con actividad anormal de células B.

Ejemplos ilustrativos de afecciones que pueden tratarse, prevenirse o mejorarse usando las células efectoras inmunes que comprenden los CAR contemplados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, miastenia grave, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Chagas, enfermedad de Grave, granulomatosis de Wegener, poliarteritis nodosa, síndrome de Sjogren, pénfigo vulgar, esclerodermia, esclerosis múltiple, síndrome antifosfolípido, vasculitis asociada a ANCA, enfermedad de Goodpasture, enfermedad de Kawasaki y progresión rápida glomerulonefritis.

Las células efectoras inmunes modificadas también pueden tener aplicación en trastornos de células plasmáticas tales como enfermedad de cadena pesada, amiloidosis primaria o asociada a inmunocitos, y gammapatía monoclonal de importancia indeterminada (MGUS).

Como se usa en el presente documento, "tumor maligno de células B" se refiere a un tipo de cáncer que se forma en las células B (un tipo de célula del sistema inmune) como se describe más adelante.

Las composiciones que comprenden células T modificadas con CAR contempladas en el presente documento pueden usarse en el tratamiento de tumores malignos hematológicos, que incluyen, pero no se limitan a tumores malignos de células B tales como, por ejemplo, mieloma múltiple (MM) y linfoma no Hodgkin (NHL).

El mieloma múltiple es una neoplasia maligna de células B de la morfología de células plasmáticas maduras caracterizada por la transformación neoplásica de un solo clon de este tipo de células. Estas células plasmáticas proliferan en la BM y pueden invadir el hueso adyacente y, a veces, la sangre. Las formas variantes de mieloma múltiple incluyen mieloma múltiple manifiesto, mieloma múltiple latente, leucemia de células plasmáticas, mieloma no secretor, mieloma IgD, mieloma osteosclerótico, plasmacitoma óseo solitario y plasmacitoma extramedular (véase, por ejemplo, Braunwald, et al. (Eds), Harrison’s Principles of Internal Medicine, 15th Edition (McGraw-Hill 2001)).

El linfoma no Hodgkin abarca un gran grupo de cánceres de linfocitos (glóbulos blancos). Los linfomas no Hodgkin pueden ocurrir a cualquier edad y a menudo están marcados por ganglios linfáticos que son más grandes de lo normal, fiebre y pérdida de peso. Existen muchos tipos diferentes de linfoma no Hodgkin. Por ejemplo, el linfoma no Hodgkin se puede dividir en tipos agresivos (de crecimiento rápido) e indolentes (de crecimiento lento). Aunque los linfomas no Hodgkin pueden derivarse de células B y células T, como se usa en el presente documento, el término "linfoma no Hodgkin" y "linfoma no Hodgkin de células B" se usan indistintamente. Los linfomas no Hodgkin de células B (LNH) incluyen el linfoma de Burkitt, la leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño (CLL/SLL), el linfoma difuso de células B grandes, el linfoma folicular, el linfoma inmunoblástico de células grandes, el linfoma precursor de células B y el linfoma de células del manto. Los linfomas que ocurren después del trasplante de médula ósea o de células madre generalmente son linfomas no Hodgkin de células B.

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es un cáncer indolente (de crecimiento lento) que causa un aumento lento de glóbulos blancos inmaduros llamados linfocitos B o células B. Las células cancerosas se diseminan a través de la sangre y la médula ósea, y también pueden afectar los ganglios linfáticos u otros órganos como el hígado y el bazo. La LLC eventualmente hace que la médula ósea falle. A veces, en etapas posteriores de la enfermedad, la enfermedad se llama linfoma linfocítico pequeño.

Se proporcionan métodos que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células efectoras inmunitarias que expresan CAR contempladas en el presente documento o una composición que comprende las mismas, a un paciente que lo necesite, solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos. Las células pueden usarse en el tratamiento de pacientes con riesgo de desarrollar una afección asociada con una actividad anormal de las células B o una neoplasia maligna de células B. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona métodos para el tratamiento o prevención de una afección asociada con actividad anormal de células B o una neoplasia maligna de células B que comprende administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente efectiva de las células modificadas con CAR contempladas en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, los términos "individuo" y "sujeto" a menudo se usan indistintamente y se refieren a cualquier animal que presente un síntoma de una enfermedad, trastorno o afección que pueda tratarse con los vectores de terapia génica, basados en células terapéutica y métodos descritos en otra parte del presente documento. Un sujeto puede incluir cualquier animal que muestre síntomas de una enfermedad, trastorno o afección del sistema hematopoyético, por ejemplo, una neoplasia maligna de células B, que puede tratarse con los vectores de terapia génica, la terapéutica basada en células y los métodos descritos en otra parte del presente documento. Los sujetos adecuados (por ejemplo, pacientes) incluyen animales de laboratorio (como ratones, ratas, conejos o conejillos

de Indias), animales de granja y animales domésticos o mascotas (como gatos o perros). Se incluyen primates no humanos y, preferiblemente, pacientes humanos. Los sujetos típicos incluyen pacientes humanos que tienen una neoplasia maligna de células B, han sido diagnosticados con una neoplasia maligna de células B, o están en riesgo o tienen una neoplasia maligna de células B. Como se usa en el presente documento, el término "paciente" se refiere a un sujeto que ha sido diagnosticado con una enfermedad, trastorno o afección particular que puede tratarse con los vectores de terapia génica, la terapéutica basada en células y los métodos divulgados en otro lugar del presente documento.

Como se usa en el presente documento "tratamiento" o "tratar", incluye cualquier efecto beneficioso o deseable sobre los síntomas o la patología de una enfermedad o afección patológica, y puede incluir incluso reducciones mínimas en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o afección tratada. El tratamiento puede incluir opcionalmente la reducción o mejora de los síntomas de la enfermedad o afección, o el retraso de la progresión de la enfermedad o afección. El "tratamiento" no indica necesariamente la erradicación o cura completa de la enfermedad o afección, o los síntomas asociados de la misma.

Como se usa en el presente documento, "prevenir" y palabras similares tales como "prevenido", "prevenir", etc., indican un enfoque para prevenir, inhibir o reducir la probabilidad de la aparición o recurrencia de una enfermedad o afección. También se refiere a retrasar el inicio o la recurrencia de una enfermedad o afección o retrasar la aparición o recurrencia de los síntomas de una enfermedad o afección. Como se usa en el presente documento, "prevención" y palabras similares también incluyen la reducción de la intensidad, efecto, síntomas y/o carga de una enfermedad o afección antes del inicio o recurrencia de la enfermedad o afección.

Por "potenciar" o "promover", o "aumentar" o "expandir" se refiere generalmente a la capacidad de una composición contemplada en el presente documento, por ejemplo, una célula T genéticamente modificada o un vector que codifica un CAR, para producir, provocar o causar una mayor respuesta fisiológica (es decir, efectos posteriores) en comparación con la respuesta causada por el vehículo o una molécula/composición de control. Una respuesta fisiológica medible puede incluir un aumento en la expansión de células T, activación, persistencia, y/o un aumento en la capacidad de matar células cancerosas, entre otros evidentes por la comprensión en la técnica y la descripción en este documento. Una cantidad "aumentada" o "mejorada" es típicamente una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir un aumento que es 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (incluidos todos los números enteros y decimales entre y por encima de 1, por ejemplo, 1.5, 1.6, 1.7. 1.8, etc.) la respuesta producida por el vehículo o una composición de control.

Por "disminuir" o "bajar" o "atenuar" o "reducir" o "abatir" se refiere generalmente a la capacidad de la composición contemplada en este documento para producir, provocar o causar una respuesta fisiológica menor (es decir, corriente abajo efectos) en comparación con la respuesta causada por el vehículo o una molécula/composición de control. Una cantidad "disminuida" o "reducida" es típicamente una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir una disminución de 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (incluidos todos los números enteros y decimales entre y por encima de 1, por ejemplo, 1.5, 1.6, 1.7. 1.8, etc.) la respuesta (respuesta de referencia) producida por el vehículo, una composición de control o la respuesta en un linaje celular particular.

Por "mantener" o "preservar" o "mantenimiento" o "sin cambio" o "sin cambio sustancial" o "sin disminución sustancial" se refiere generalmente a la capacidad de una composición contemplada en este documento para producir, provocar, o causar una respuesta fisiológica menor (es decir, efectos posteriores) en una célula, en comparación con la respuesta causada por cualquier vehículo, una molécula/composición de control, o la respuesta en un linaje celular particular. Una respuesta comparable es aquella que no es significativamente diferente o medible diferente de la respuesta de referencia.

Un método para tratar una afección relacionada con células B en un sujeto que lo necesita comprende administrar una cantidad eficaz, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende células efectoras inmunes modificadas genéticamente contempladas en el presente documento. La cantidad y la frecuencia de la administración estarán determinadas por factores tales como la condición del paciente y el tipo y la gravedad de la enfermedad del paciente, aunque los ensayos clínicos pueden determinar las dosis apropiadas.

La cantidad de células T en la composición administrada a un sujeto puede ser al menos $0.1 \times 10^5$ células, al menos $0.5 \times 10^5$ células, al menos $1 \times 10^5$ células, al menos $5 \times 10^5$ células, al menos $1 \times 10^6$ celdas, al menos $0.5 \times 10^7$ celdas, al menos $1 \times 10^7$ celdas, al menos $0.5 \times 10^8$ celdas, al menos $1 \times 10^8$ celdas, al menos $0.5 \times 10^9$ celdas, al menos $1 \times 10^9$ celdas, al menos $2 \times 10^9$ celdas , al menos $3 \times 10^9$ celdas, al menos $4 \times 10^9$ celdas, al menos $5 \times 10^9$ celdas, o al menos $1 \times 10^{10}$ celdas. En realizaciones particulares, aproximadamente $1 \times 10^7$ células T CAR a aproximadamente $1 \times 10^9$ células T CAR, aproximadamente $2 \times 10^7$ células T CAR a aproximadamente $0.9 \times 10^9$ células T CAR, aproximadamente $3 \times 10^7$ células T CAR a aproximadamente $0.8 \times 10^9$ CAR T células, aproximadamente $4 \times 10^7$ células T CAR a aproximadamente $0.7 \times 10^9$ células T CAR, aproximadamente $5 \times 10^7$ células T CAR a aproximadamente $0.6 \times 10^9$ células T CAR, o aproximadamente $5 \times 10^7$ células T CAR a aproximadamente $0.5 \times 10^9$ células T son administradas a un sujeto.

La cantidad de células T en la composición administrada a un sujeto puede ser al menos 0.1 x $10^4$ células/kg de peso corporal, al menos 0.5 x $10^4$ células/kg de peso corporal, al menos 1 x $10^4$ células/kg de peso corporal, al menos 5 x $10^4$ células/kg de peso corporal, al menos 1 x $10^5$ células/kg de peso corporal, al menos 0.5 x $10^6$ células/kg de peso corporal, al menos 1 x $10^6$ células/kg de peso corporal, al menos 0.5 x $10^7$ células/kg de peso corporal, al menos 1 x $10^7$ células/kg de peso corporal, al menos 0.5 x $10^8$ células/kg de peso corporal, al menos 1 x $10^8$ células/kg de peso corporal, al menos 2 x $10^8$ células/kg de peso corporal, a al menos 3 x $10^8$ células/kg de peso corporal, al menos 4 x $10^8$ células / kg de peso corporal, al menos 5 x $10^8$ células/kg de peso corporal, o al menos 1 x $10^9$ células/kg de peso corporal. Aproximadamente 1 x $10^6$ células T CAR/kg de peso corporal a aproximadamente 1 x $10^8$ células T CAR/kg de peso corporal, aproximadamente 2 x $10^6$ células T CAR/kg de peso corporal a aproximadamente 0.9 x $10^8$ células T CAR/kg de peso corporal, aproximadamente 3 x $10^6$ células T CAR/kg de peso corporal a aproximadamente 0.8 x $10^8$ células T CAR/kg de peso corporal, aproximadamente 4 x $10^6$ células T CAR/kg de peso corporal a aproximadamente 0.7 x $10^8$ células T CAR/kg de peso corporal, aproximadamente 5 x $10^6$ Las células T CAR/kg de peso corporal a aproximadamente 0.6 x $10^8$ células T CAR/kg de peso corporal, o aproximadamente 5 x $10^6$ células T CAR/kg de peso corporal a aproximadamente 0.5 x $10^8$ células T CAR/kg de peso corporal pueden ser administradas a un sujeto.

Un experto habitual en la técnica reconocería que pueden requerirse múltiples administraciones de las composiciones para efectuar la terapia deseada. Por ejemplo, una composición puede administrarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más veces durante un período de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años, 10 años o más.

Puede ser deseable administrar células efectoras inmunes activadas a un sujeto y luego reextraer sangre (o realizar una aféresis), activar células efectoras inmunes a partir de ellas y reinfundir al paciente con estas células efectoras inmunes activadas y expandidas. Este proceso puede llevarse a cabo varias veces cada pocas semanas. En ciertas realizaciones, las células efectoras inmunes pueden activarse a partir de extracciones de sangre de 10 cc a 400 cc. Las células efectoras inmunitarias pueden activarse a partir de extracciones de sangre de 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc, 100 cc, 150 cc, 200 cc, 250 cc, 300 cc, 350 cc o 400 cc o más. No debe limitarse a la teoría, el uso de este protocolo de extracción de sangre múltiple/reinfusión múltiple puede servir para seleccionar ciertas poblaciones de células efectoras inmunes.

La administración de las composiciones contempladas en el presente documento puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, incluyendo por inhalación, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Preferiblemente, las composiciones se administran parenteralmente. Las expresiones "administración parenteral" y "administrado parenteralmente", como se usan en el presente documento, se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, generalmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravascular, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intratumoral, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal. En una realización, las composiciones contempladas en el presente documento se administran a un sujeto mediante inyección directa en un tumor, ganglio linfático o sitio de infección.

A un sujeto que lo necesite se le puede administrar una cantidad efectiva de una composición para aumentar la respuesta inmune celular a una afección relacionada con células B en el sujeto. La respuesta inmune puede incluir respuestas inmunes celulares mediadas por células T citotóxicas capaces de matar células infectadas, células T reguladoras y respuestas de células T auxiliares. También se pueden inducir respuestas inmunes humorales, mediadas principalmente por células T auxiliares capaces de activar las células B, lo que conduce a la producción de anticuerpos. Se puede usar una variedad de técnicas para analizar el tipo de respuestas inmunes inducidas por las composiciones, que se describen bien en la técnica; por ejemplo, Current Protocols in Immunology, editado por: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.

En el caso de la muerte mediada por células T, la unión del ligando CAR inicia la señalización de CAR a la célula T, dando como resultado la activación de una variedad de vías de señalización de células T que inducen a la célula T a producir o liberar proteínas capaces de inducir apoptosis de la célula diana por diversos mecanismos. Estos mecanismos mediados por células T incluyen (pero no se limitan a) la transferencia de gránulos citotóxicos intracelulares de la célula T a la célula diana, la secreción de células T de citoquinas proinflamatorias que pueden inducir la muerte de células objetivo directamente (o indirectamente a través del reclutamiento de otras células efectoras asesinas) y una regulación ascendente de los ligandos del receptor de la muerte (por ejemplo, FasL) en la superficie de las células T que inducen la apoptosis de las células diana después de la unión a su receptor de muerte afín (por ejemplo, Fas) en la célula diana.

También se proporciona un método para tratar a un sujeto diagnosticado con una afección relacionada con células B que comprende eliminar células efectoras inmunes de un sujeto diagnosticado con una afección relacionada con células B que expresa BCMA, modificando genéticamente dichas células efectoras inmunes con un vector que comprende un nucleico ácido que codifica un CAR como se contempla en el presente documento, produciendo así una población de células efectoras inmunes modificadas, y administrando la población de células efectoras inmunes modificadas al mismo sujeto. Preferiblemente, las células efectoras inmunes comprenden células T.

También se proporcionan métodos para estimular una respuesta inmunomoduladora mediada por células efectoras inmunes a una población de células diana en un sujeto que comprende los pasos de administrar al sujeto una población de células efectoras inmunes que expresa una construcción de ácido nucleico que codifica una molécula CAR.

Los métodos para administrar las composiciones celulares descritas en el presente documento incluyen cualquier método que sea eficaz para dar como resultado la reintroducción de células efectoras inmunes modificadas genéticamente ex vivo que expresen directamente un CAR en el sujeto o en la reintroducción de los progenitores genéticamente modificados de células efectoras inmunes que al introducirse en un sujeto se diferencian en células efectoras inmunes maduras que expresan el CAR. Un método comprende transducir células T de sangre periférica ex vivo con un constructo de ácido nucleico y devolver las células transducidas al sujeto.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1**

Construcción de CAR BCMA

Los CAR que contenían anticuerpos scFv anti-BCMA murinos se diseñaron para contener un promotor MND unido operativamente a scFv anti-BMCA, un dominio bisagra y transmembrana de CD8α y un dominio coestimulador CD137 seguido por el dominio de señalización intracelular de la cadena CD3ζ. Véase, por ejemplo, la Figura 1. El BCMA CAR que se muestra en la Figura 1 comprende una secuencia de Péptido de señalización (SP) CD8α para la expresión de superficie en células efectoras inmunes. La secuencia polinucleotídica de un ejemplo de BCMA CAR se expone en la SEQ ID NO: 10; un ejemplo de secuencias de polipéptidos de un BCMA CAR se expone en SEQ ID NO: 9; y un mapa vectorial de una construcción CAR ejemplar se muestra en la Figura 1. La Tabla 3 muestra la Identidad, Referencia de Genbank, Nombre de Fuente y Cita para los diversos segmentos de nucleótidos de un vector lentiviral CAR BCMA.

Tabla 3.

| Nucleótidos | Identidad | Referencia de GenBank | Nombre de la fuente | Citación |
|---|---|---|---|---|
| 1-185 | columna vertebral del plásmido pUC19 | Acceso #L09137.2 nt 1 - 185 | pUC19 | New England Biolabs |
| 185-222 | Enlace | No aplica | Sintético | No aplica |
| 223-800 | CMV | No Aplica | pHCMV | (1994) PNAS 91: 9564-68 |
| 801-1136 | R, U5, PBS y secuencias de empaquetamiento | Acceso #M19921.2 nt 454-789 | pNL4-3 | Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43 |
| 1137-1139 | El codón de inicio de la mordaza (ATG) cambió para detener el codón (TAG) | No Aplica | Síntético | No aplica |
| 1140-1240 | Secuencia de mordaza de VIH-1 | Acceso #M19921.2 nt 793-893 | pNL4-3 | Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43 |
| 1241-1243 | La secuencia de la mordaza del VIH -1 cambió a un segundo codón de parada | No Aplica | Sintético | No aplica |

| Nucleótidos | Identidad | Referencia de GenBank | Nombre de la fuente | Citación |
|---|---|---|---|---|
| 1244-1595 | Secuencia de mordaza de VIH-1 | Acceso #M19921.2 nt 897-1248 | pNL4-3 | Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43 |
| 1596-1992 | HIV-1 pol cPPT/CTS | Acceso #M19921.2 nt 4745-5125 | pNL4-3 | Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43 |
| 1993-2517 | VIH-1, aislar región HXB3 env (RRE) | Acceso #M14100.1 nt 1875-2399 | PgTAT-CMV | Malim, M. H. Nature (1988) 335:181-183 |
| 2518-2693 | Secuencias env de VIH-1 S/A | Acceso #M19921.2 nt 8290-8470 | pNL4-3 | Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43 |
| 2694-2708 | Enlace | No aplica | Sintético | No aplica |
| 2709-3096 | MND | No aplica | pccl-c-MNDU3c-x2 | Challita et al. (1995) J.Virol. 69: 748-755 |
| 3097-3124 | Enlace | No aplica | Síntético | No aplica |
| 3125-3187 | Péptido de señalización | Acceso # NM_001768 | CD8a Péptido de señalización | No aplica |
| 3188-3934 | BCMA02 scFv ($V_L$1-enlace-$V_H$0) | No aplica | Sintético | No aplica |
| 3935-4141 | Bisagra CD8a y TM | Acceso # NM_001768 | Bisagra CD8a y TM | Milone et al (2009) Mol Ther 17(8):1453-64 |
| 4144-4269 | CD137 (4-1BB) dominio de señalización | Acceso # NM_001561 | Dominio de señalización CD137 | Milone et al (2009) Mol Ther 17(8):1453-64 |
| 4270-4606 | CD3-ζ dominio de señalización | | | Milone et al (2009) |

| Nucleótidos | Identidad | Referencia de GenBank | Nombre de la fuente | Citación |
|---|---|---|---|---|
| | | Acceso # NM_000734 | CD3-ζ dominio de señalización | Mol Ther 17(8):1453-64 |
| 4607-4717 | HIV-1 ppt y parte de 3'U3 | Acceso #M19921.2 nt 9005-9110 | pNL4-3 | Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43 |
| 4718-4834 | VIH-1 parte de U3 (eliminación de 399 pb) y R | Acceso #M19921.2 nt 9511-9627 | pNL4-3 | Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43 |
| 4835-4858 | PoliA sintético | No aplica | Sintético | Levitt, N. Genes & Dev (1989) 3:1019-1025 |
| 4859-4877 | Enlace | No aplica | Sintético | No Aplica |
| 4878-7350 | columna vertebral pUC19 | Acceso #L09137.2 nt 2636-2686 | pUC19 | New England Biolabs |

**Ejemplo 2**

**Evaluación de un CAR murine BCMA**

Introducción

La transferencia adoptiva de células T genéticamente modificadas con receptores de antígeno quiméricos (CAR) se ha convertido en un enfoque prometedor para tratar el cáncer. Un CAR es una molécula artificial compuesta de un fragmento variable de cadena simple (scFv) reactivo a antígeno fusionado a dominios de señalización de células T a través de una región transmembrana. En este ejemplo, se evaluó una molécula CAR específica para el antígeno de maduración de células B (BCMA). BCMA se expresa en mieloma múltiple, plasmacitoma y algunos linfomas, pero la expresión normal se limita a las células plasmáticas (Avery et al., 2003; Carpenito et al., 2009; Chiu et al., 2007).

El CAR anti-BCMA02 se construyó usando secuencias de un anticuerpo anti-BCMA de ratón (C11D5.3). Anti-BCMAIO CAR se construyó utilizando secuencias modificadas y es una versión "humanizada" de anti-BCMA02 CAR. En una serie de ensayos in vitro, las células T CAR anti-BCMA02 y las células T CAR CAR anti-BCMA10 exhibieron ambas especificidad tumoral, alta expresión de CAR y provocó una potente reactividad a los objetivos que expresan antígeno. Se demostró que las células T CAR anti-BCMA02 y las células CAR T anti-BCMA10 tienen una reactividad comparable a las líneas de células tumorales que expresan BCMA. Aunque tanto las células CAR T anti-BCMA02 como las células CAR T anti-BCMA10 fueron capaces de causar regresiones en un modelo de tumor de ratón, las células CAR T anti-BCMA10 mostraron secreción de citoquinas inflamatorias independientes del antígeno y, por lo tanto, tienen el potencial de causar toxicidades clínicas altos niveles de citoquinas asociados.

Resultados

Liberación de citoquinas inflamatorias tónicas de las células T anti-BCMA10 asociadas con apoptosis

La proteína BCMA es detectable en el suero de pacientes con mieloma múltiple (Sánchez et al., 2012). El BCMA sérico promedio en pacientes con mieloma múltiple fue de 10 ng/ml, pero alcanzó su punto máximo en niveles de hasta 100 ng/ml. Se evaluó el impacto de los niveles fisiológicos de BCMA soluble en los candidatos a células T CAR anti-BCMA.

La liberación de IFNγ de las células T CAR anti-BCMA02, las células CART anti-BCMA10 y las células T CAR19Δ se examinó después de un cultivo de 24 horas con BCMA soluble (Figura 2a). Las células T CAR anti-BCMA02 respondieron con una liberación mínima de citoquinas después de un cultivo de 24 horas con hasta 1 µg/ml de BCMA. Por el contrario, las células T CAR anti-BCMA10 respondieron con niveles crecientes de IFNγ que eran proporcionales a la concentración de BCMA soluble añadida al cultivo. A 100 ng/ml de BCMA, los niveles máximos informados en pacientes con mieloma múltiple, las células T CAR anti-BCMA10 secretaban 82.1 ng/ml IFNγ en comparación con el IFNγ 28.8 ng/ml secretado por las células T CAR anti-BCMA02. Incluso se detectó IFNγ en varios experimentos de cocultivo con células T CAR anti-BCMA10 más líneas celulares de control que carecían de antígeno BCMA (Figura 2b, cocultivo K562). Estos datos sugirieron que las células T CAR anti-BCMA10 tenían una mayor sensibilidad a la estimulación por BCMA soluble y el potencial de respuestas de citoquinas independientes del antígeno en las células T.

Se examinó el potencial de secreción de citoquinas tónicas de células T CAR anti-BCMA02, células T CAR anti-BCMA10 (10 días desde el inicio del cultivo) y células T CAR19Δ. Después de la fabricación de las células T CAR, se analizó la presencia de citoquinas inflamatorias en los medios de crecimiento de las células CAR T anti-BCMA02, células T CAR anti-BCMA10 y células T CAR19Δ. A pesar de la ausencia de estimulación antigénica, los cultivos de células T CAR anti-BCMA10 contenían más de 10 ng/ml de IFNγ en comparación con menos de 1 ng/ml de IFNγ en cultivos de células T CAR anti-BCMA02 (Figura 3). Los cultivos de células T anti-BCMA10 CAR también contenían significativamente ($p<0.001$) más TNFα. Para cuantificar aún más la cantidad de citoquina producida por las células T CAR anti-BCMA10 sin estimulación antigénica, se midió la liberación de citoquinas a partir de $5 \times 10^4$ células T CAR durante un cultivo de 24 horas. Las células T CAR anti-BCMA10 produjeron cantidades significativamente mayores de citoquinas inflamatorias MIP1α, IFNγ, GMCSF, MIP1β, IL-8 y TNFα en comparación con las células T CAR anti-BCMA02 (Figura 4, $p<0.0001$). Las concentraciones de MIP1α e IFNγ fueron las más altas entre todas las citoquinas examinadas. Las células T CAR anti-BCMA10 produjeron 4.7 ng MIP1α/$5 \times 10^4$ células/24 horas, 3.0 ng IFNγ/$5 \times 10^4$ células/24 horas y ~1 ng/$5 \times 10^4$ células/24 horas o menos de las otras citoquinas. No se detectaron diferencias significativas en las citoquinas antiinflamatorias IL-10, IL-2 e IL-4.

La expresión de marcadores fenotípicos de activación de células T al final de la fabricación de células T anti-BCMA10 CAR se midió para examinar si la secreción de citoquinas inflamatorias tónicas era indicativa de un estado hiperactivo en las células T anti-BCMA10 CAR. HLA-DR y CD25 son marcadores de superficie que normalmente exhiben pico de expresión 12-24 horas después de la activación de las células T y luego disminuyen con el tiempo. Las células T CAR preparadas a partir de tres donantes normales mostraron que un promedio de 40±2% de las células T CAR anti-BCMA02 expresaron HLA-DR. La expresión de HLA-DR en estas células fue comparable a las células T no transducidas (43±2.3%) y las células T de control CAR19Δ (32±2.2%). En contraste, 88±1.2% de células T CAR anti-BCMA10 expresaron HLA-DR (Figura 5). La expresión de otro marcador de activación CD25 también fue mayor en las células T CAR anti-BCMA10 en comparación con las células T CAR anti-BCMA02 (53±0.9% frente a 35±2.4%). Por lo tanto, las células T CAR anti-BCMA10 exhibieron características fenotípicas de las células T activadas en ausencia de antígenos añadidos.

La hiperactividad en las células T a menudo se asocia con la muerte celular inducida por activación (AICD) por apoptosis. Se midieron los niveles de caspasa-3 activada para examinar si la hiperactividad de las células T CAR anti-BCMA10 podría dar como resultado niveles apoptóticos más altos en comparación con las células T CAR anti-BCMA02. El 48% de las células T CAR anti-BCMA10 de dos donantes tenían caspasa-3 activa en comparación con el 16% de las células T CAR anti-BCMA02 (Figura 6). Por lo tanto, en ausencia de antígeno BCMA agregado, las células T CAR anti-BCMA10 contienen una mayor frecuencia de células apoptóticas asociadas con una mayor activación y secreción inflamatoria de citoquinas en comparación con las células T CAR anti-BCMA02.

Se evaluaron las células T CAR anti-BCMA02 y las células T CAR anti-BCMA10 para determinar si las células T CAR podrían responder selectivamente a niveles bajos de BCMA o ser reactivas cruzadas a un antígeno no relacionado en el suero humano utilizado para el crecimiento de células T. Las células T CAR anti-BCMA02 y las células T CAR anti-BCMA10 se mantuvieron en medios que carecían de suero humano durante dos días y luego se cambiaron a medios que contenían suero fetal bovino (FBS), suero humano (HABS) o HABS en presencia o ausencia de 100 ng/ml de BCMA soluble (Figura 7). La liberación de IFNγ se analizó 24 horas después mediante ELISA. Tanto las células T CAR anti-BCMA02 como las células T CAR anti-BCMA10 respondieron a BCMA soluble. Sin embargo, las células T CAR anti-BCMA10 secretan 10 veces más IFNγ que las células T CAR anti-BCMA02. En ausencia de BCMA, solo las células T CAR anti-BCMA10 liberaron IFNγ independientemente del cultivo en suero bovino fetal (FBS) ($p=0.0002$) o suero AB humano (HABS) ($p=0.0007$). Estos datos sugirieron que la secreción inflamatoria de citoquinas era intrínseca a las células T CAR anti-BCMA10.

Función antitumoral inferior de células T CAR anti-BCMA10 en modelo de ratón de mieloma múltiple

La hiperactivación y el aumento de la apoptosis podrían afectar negativamente la persistencia de células T CAR en pacientes y, en última instancia, la eficacia clínica. La función antitumoral de las células T CAR anti-BCMA02 y las células T CAR anti-BCMA10 se examinó en un modelo de tumor de ratón. Los ratones NOD scid gamma (NSG) con tumores de mieloma múltiple humano subcutáneo experimental ~100 $mm^3$ (RPMI-8226) fueron tratados con $10^7$ células T CAR anti-BCMA02, $10^7$ células T CAR anti-BCMA10 o Bortezomib (velcade). El crecimiento de RPMI-8226 se controló con calibradores. En dos experimentos independientes (Figuras 8a y 8b), Bortezomib controló el

crecimiento tumoral en comparación con los animales de control del vehículo. Los animales transferidos adoptivamente con células T CAR anti-BCMA02 exhibieron un aclaramiento tumoral rápido y duradero (las gráficas de inserción magnifican las regresiones tumorales tempranas). La transferencia adoptiva de células T CAR anti-BCMA10 también causó regresiones tumorales, pero se retrasó en ambos experimentos en comparación con las células T CAR anti-BCMA02.

Conclusiones

Las células T CAR anti-BCMA02 y las células CAR T anti-BCMA10 exhibieron una función antitumoral comparable en ensayos in vitro, pero las células T CAR anti-BCMA10 tenían características que podrían afectar negativamente la seguridad y la eficacia en el tratamiento del paciente. Las células T CAR anti-BCMA10 respondieron de manera robusta con secreción inflamatoria de citoquinas después de la exposición a niveles fisiológicos de proteína BCMA. La tormenta de citoquinas o el síndrome de liberación de citoquinas es una toxicidad clínica conocida asociada con las terapias con células T CAR. Las preocupaciones sobre la liberación de citoquinas a BCMA empeoraron después de la observación de la actividad tónica de las células T CAR anti-BCMA10. Incluso en ausencia de estimulación antigénica, las células T CAR anti-BCMA10 liberaron altos niveles de citoquinas inflamatorias. La secreción persistente de citoquinas tiene el potencial de causar toxicidades clínicas sustanciales, así como impactar negativamente la función antitumoral. De hecho, se encontró una mayor composición de células apoptóticas y una función antitumoral inferior en las células T CAR anti-BCMA10 en comparación con los cultivos de células T CAR anti-BCMA02 en un modelo de ratón con mieloma múltiple.

Referencias

Avery et al., (2003). BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. J Clin Invest, 112(2), 286-297.

Carpenito et al., (2009). Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. Proc Natl Acad Sci USA, 106(9), 3360-3365.

Chiu et al., (2007). Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. Blood, 109(2), 729-739.

Sánchez et al. (2012) Serum B-cell maturation antigen is elevated in multiple myeloma and correlates with disease status and survival. Br J Haematol, 158(6), 727-738.

**Ejemplo 3**

La expresión mínima de BCMA en linfomas activa las células T de CAR anti-BCMA

Se midió el nivel de expresión de BCMA en líneas celulares de linfoma y leucemia (Daudi and Raji) para determinar si la expresión era suficiente para activar células T CAR anti-BCMA02.

La expresión de BCMA en linfoma, leucemia y células de mieloma múltiple se cuantificó usando citometría de flujo. En este ensayo, se evaluó la expresión relativa de BCMA en las células correlacionando la intensidad de fluorescencia de la expresión de BCMA con un número conocido de anticuerpos unidos (capacidad de unión a anticuerpos, ABC). Los niveles de expresión de BCMA en las líneas celulares de linfoma se compararon con los niveles de expresión de BCMA, una línea celular de mieloma múltiple (RPMI-8226) que se sabe que activa las células T CAR anti-BCMA02. Se expresaron 12590±1275 moléculas de BCMA02 en la superficie de las células RPMI-8226. Por el contrario, las células Daudi expresaron 1173±234 moléculas BCMA02 y las células JeKo-1 (una línea celular de linfoma de células Mantle) expresaron solo 222±138 moléculas BCMA02 (Figura 9, círculos).

En otro conjunto de experimentos se probó la actividad de las células T CAR anti-BCMA02 a los niveles mínimos de BCMA observados en las líneas celulares de linfoma y leucemia (Figura 9, recuadros). Las células T CAR anti-BCMA02 se generaron usando métodos estándar y la actividad se evaluó mediante ELISA IFNγ después del cocultivo con líneas celulares tumorales BCMA-positivas y BCMA-negativas. La reactividad de las células T CAR anti-BCMA02 se correlacionó con la cantidad relativa de expresión de ARNm de BCMA (por encima de un umbral) y/o la densidad del receptor de BCMA en la superficie de varias líneas celulares tumorales después del cocultivo (Figura 9). Poco, si alguno, se libera IFNγ en el cocultivo de las células T BCMA CAR con líneas celulares tumorales negativas para BCMA (BCMA-): leucemia mielógena (K562), leucemia linfoblástica aguda (NALM-6 y NALM-16); linfoma de células del manto (REC-1); o linfoma de Hodgkin (HDLM-2). En contraste, se liberaron cantidades sustanciales de IFNγ tras el cocultivo de células T CAR BCMA02 con líneas celulares tumorales positivas para BCMA (BCMA+): leucemia linfoblástica crónica de células B (MEC-1), linfoma de células del manto (JeKo-1), linfoma de Hodgkin (RPMI-6666), linfoma de Burkitt (células de Daudi y células de Ramos) y mieloma múltiple (RPMI-8226).

La reactividad de las células T CAR anti-BCMA02 a las células de linfoma de Burkitt (células Daudi) que expresan BCMA se extendió a estudios en animales in vivo. Las células Daudi también expresan CD19. La actividad in vivo de las células T CAR anti-BCMA02 se comparó con la actividad in vivo de las células T CAR anti-CD 19. Los ratones NOD scid gamma (NSG) fueron inyectados IV con 2 x $10^6$ células Daudi y se les permitió acumular una gran carga

tumoral sistémica antes de ser tratados con células T CAR. Las células T CAR se administraron a los 8 días y 18 días después de la inducción tumoral (Figuras 10A y 10B, respectivamente). El vehículo y el control negativo (células T CAR anti-CD19Δ) no pudieron evitar el crecimiento del tumor, como se muestra por los aumentos de la fase logarítmica en la bioluminiscencia, lo que resultó en la pérdida de peso y muerte (Figura 10A, dos paneles de ratón a la izquierda). Las células T CAR anti-CD 19 y anti-BCMA02 impidieron el crecimiento tumoral, lo que resultó en el mantenimiento del peso corporal y supervivencia. Las células T CAR anti-CD 19 y anti-BCMA02 fueron igualmente efectivas cuando se administraron el día 8 (Figura 10A, dos paneles de ratón a la derecha). Las células T CAR anti-BCMA02 también fueron efectivas para disminuir la carga tumoral cuando se administraron a los 18 días después de la inducción tumoral. Figura 10B, panel de la derecha.

**Ejemplo 4**

Potente actividad In vitro de células T CAR anti-BCMA

La actividad in vitro potente de las células T CAR anti-BCMA02 se logró con una reducción del 50 por ciento de la expresión de anti-BCMA02 CAR. Las poblaciones de células T se transdujeron con entre $4x10^8$ y $5x10^7$ unidades transductoras de un lentivirus que codifica una molécula CAR anti-BCMA02. Las poblaciones de células T resultantes mostraron una frecuencia reducida de células T CAR anti-BCMA02 (analizada como porcentaje positivo) y una expresión reducida de moléculas CAR anti-BCMA02 (analizadas como intensidad de fluorescencia media: MFI).

Se determinó el impacto de la expresión reducida de la molécula CAR en la actividad anti-BCMA02. La frecuencia de las células T positivas para CAR anti-BCMA se normalizó con células T no transducidas para contener 26 ± 4% de células T reactivas a BCMA (Figura 11A). La IMF de las células T CAR anti-BCMA02 normalizadas osciló entre 885 y 1875 (Figura 11B). K562 es una línea celular CML que carece de expresión BCMA. Las células K562 se diseñaron para expresar BCMA y se usaron en un ensayo citolítico in vitro para evaluar la actividad de las células T CAR anti-BCMA02 con expresión variada de BCMA CAR (Figura 11C). Las células K562 se marcaron con traza celular violeta mientras que las células K562 que expresaban BCMA de forma estable (K562-BCMA) se marcaron con CFSE. Las células T, las células K562 y las células K562-BCMA se cosecharon, lavaron y resuspendieron en medios que carecían de citoquinas exógenas. Las células se cultivaron a una proporción de 20:1 o 10:1 (E; célula T) a la diana (T; mezcla 1:1 de células K562 y K562 BCMA) durante 4 h en una incubadora de $CO_2$ al 5% a 37ºC. Luego, las células se tiñeron con Live/Dead y se analizaron mediante FACS. La citotoxicidad se determinó por la diferencia en la proporción de células K562:K562-BCMA normalizadas a condiciones que carecen de células T.

**Ejemplo 5**

Proceso de fabricación de células T CAR anti-BCMA

Se fabrican productos únicos de células T CAR anti-BCMA02 para el tratamiento de cada paciente. La fiabilidad del proceso de fabricación de productos de células T CAR anti-BCMA02 se evaluó mediante la generación de células T CAR anti-BCMA02 a partir de 11 PBMC de donantes normales individuales. La expansión de células T CAR anti-BCMA02 de cada donante fue comparable a un cultivo no transducido compatible realizado en paralelo (Figura 12A).

Al final del período de cultivo (día 10), se evaluó la eficacia de la transducción de células T cuantificando el número de lentivirus integrados con qPCR y conjuntos de cebadores específicos de lentivirales (número de copia del vector, VCN). Los cultivos de células T CAR anti-BCMA02 de los 11 donantes mostraron una eficiencia de transducción lentiviral comparable (Figura 12B). La frecuencia de las células T positivas anti-BCMA02 CAR se midió por citometría de flujo y se encontró que la expresión de BCMA es comparable en todos los donantes (Figura 12C).

La actividad de cada producto de células T CAR anti-BCMA02 se evaluó mediante liberación de IFNy después del cocultivo con células K562 diseñadas para expresar BCMA. Todos los productos de células T CAR anti-BCMA02 exhibieron niveles terapéuticamente relevantes de liberación de IFNy cuando se expusieron a células K562 que expresan BCMA (Figura 12D).

**Ejemplo 6**

Expresión de CD62L, CD127, CD197 y CD38 en células de CAR tratadas con IL-2 O IL-2 y ZSTK474

Las células T de CAR cultivadas con IL-2 y ZSTK474 muestran una mayor expresión de CD62L en comparación con las células T de CAR cultivadas con IL-2 solo. El análisis de expresión de 29 marcadores de superficie celular adicionales en células T CAR anti-BCMA02 cultivadas con IL-2 y ZSTK474 se realizó usando citometría de masas multiparamétrica (CyTOF) y se comparó con células T CAR cultivadas solo en IL-2. Tres marcadores adicionales (CD127, CD197 y CD38) mostraron una mayor expresión en las células T CAR tratadas con IL-2 + ZSTK474 en comparación con las células T CAR tratadas con IL-2 solo. Por lo tanto, la coexpresión de CD62L, CD127, CD197 y CD38 estratificó adicionalmente células T CAR cultivadas con ZSTK474. Después del cultivo en medios que contienen IL-2, el 7.44% de células TCAR anti-BCMA02 coexpresó CD127, CD197 y CD38 en comparación con el 24.5% de las células T CAR anti-BCMA02 cultivadas con IL-2 y ZSTK474. El diagrama de Venn en la Figura 13 ilustra la coexpresión de CD127, CD197 y CD38 en células T anti-BCMA02 positivas para CD62L.

**Ejemplo 7**

El tratamiento ZSTK474 aumenta la frecuencia de las células T CD8

La expresión de CD8 se cuantificó en células T CAR anti-BCMA02 tratadas con IL-2 solo o IL-2 y ZSTK474. La expresión de CD8 se determinó usando un anticuerpo anti-CD8 marcado con fluorescencia y citometría de flujo. Las células T CAR anti-BCMA02 de siete donantes normales cultivadas con IL-2 y ZSTK474 tenían una expresión de CD8 significativamente mayor en comparación con las células T CAR anti-BCMA02 cultivadas con IL-2 solo. Figura 14

**Ejemplo 8**

Falta de actividad independiente de antígeno en células T de CAR anti-BCMA tratadas ZSTK474

La actividad tónica de las células T CAR en ausencia de antígeno se ha asociado con una actividad biológica reducida. La actividad tónica de las células T CAR anti-BCMA02 se evaluó cuantificando la liberación de interferón-γ (IFN-γ) en ausencia de antígeno después del cultivo en presencia de IL-2 y ZSTK474 en comparación con las condiciones de cultivo estándar con IL-2 solo. Los cultivos de células T CAR anti-BCMA se prepararon usando un sistema directamente escalable a grandes procesos de fabricación clínica. En resumen, se cultivaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en matraces estáticos en medios que contenían IL-2 (CellGenix) y anticuerpos específicos para CD3 y CD28 (Miltenyi Biotec). Se añadieron $2x10^8$ unidades transductoras de lentivirus que codifican CAR anti-BCMA un día después del inicio del cultivo.

Las células T CAR anti-BCMA02 se mantuvieron en fase logarítmica añadiendo medios frescos que contenían IL-2 y una dosis optimizada de ZSTK474 para un total de diez días de cultivo. Al final de la fabricación, se volvió a cultivar un número equivalente de células T CAR anti-BCMA02 durante 24 horas solo en medio. La cantidad de IFN-γ liberada en 24 horas se cuantificó por ELISA. En este ensayo, los niveles de IFN-γ por debajo de 200 pg/ml no representan actividad tónica. La Figura 15 muestra que la cantidad de IFN-γ liberado por las células T CAR anti-BCMA02 de 14 donantes es consistente con la falta de actividad tónica, independientemente de si las células T CAR se cultivan o no con ZSTK474.

**Ejemplo 9**

Las células T de CAR anti-BCMA02 tratadas con ZSTK474 muestran actividad terapéutica en un modelo de tumor de linfoma

Los tumores Daudi se usaron para interrogar la actividad antitumoral de las células T CAR anti-BCMA02 cultivadas con IL-2 o IL-2 y ZSTK474. Las células Daudi expresan un bajo nivel de proteína BCMA y proporcionan un modelo de tumor de linfoma agresivo y difícil de tratar.

Se marcaron 2 x $10^6$ células tumorales Daudi con un gen de luciferasa de luciérnaga y se inyectaron en ratones anulados de cadena gamma (NSG) del receptor de IL-2 NOD scid mediante inyección intravenosa. Después de permitir que se formaran los tumores, se inyectaron $1x10^7$ células T CAR en ratones portadores de tumores. Los ratones fueron inyectados con i) células T CAR anti-BCMA02 tratadas durante diez días con IL-2 o IL-2 y ZSTK474; o ii) una célula T CAR anti-BCMA02 (tBCMA02) deficiente de señalización truncada tratada durante diez días con IL-2 y ZSTK474. El crecimiento tumoral se controló por bioluminiscencia utilizando un sistema de imagen Xenogen-IVIS.

Se observó una regresión tumoral completa en el 50% de los ratones a los que se administraron las células T CAR anti-BCMA02 tratadas con IL-2 y ZSTK474. Figura 16

**Ejemplo 10**

Las células T de CAR tratadas ZSTK474 muestran actividad terapéutica en un modelo de ratón de mieloma humano

Los animales con tumores de mieloma múltiple subcutáneo de 100 $mm^3$ (RPMI-8226) se infundieron con dosis equivalentes de células T CAR ($1x10^6$ células T positivas para CAR-BCMA02) o células T no modificadas de un donante de células T compatible (no transducido). Las células T CAR anti-BCMA se trataron con IL-2 o IL-2 y ZSTK474 como se describe en el Ejemplo 8.

Los animales tratados con IL-2 o IL-2 y células T CAR anti-BCMA02 cultivadas con ZSTK474 impidieron completamente la proliferación tumoral. Figura 17. En contraste, los animales tratados con no transducidos o con vehículo no pudieron controlar el crecimiento tumoral. Figura 17

Listado de secuencias

<110> bluebird bio, Inc.

Morgan, Richard

Friedman, Kevin

<120> <120> RECEPTORES DE ANTIGENO QUIMERICO BCMA

<130> BLBD-043/02WO

<150> US 62/091,419

<151> 2014-12-12

<150> US 62/200,505

<151> 2015-08-03

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His
1 5 10 15

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 2

Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 3

Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr
1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Asp Tyr Ser Ile Asn
1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 7

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

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

Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu
            20                  25                  30

Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala
    50                  55                  60

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

Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg
                85                  90                  95

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110        <
```

210> 8

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

```
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1               5                  10                  15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe
    50                  55                  60

Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

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

Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 9

<211> 493

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> anti-BCMA02 CAR

<400> 9

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

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

Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
        35                  40                  45

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

```
Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
65                  70                  75                  80

Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
                85                  90                  95

Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr
            100                 105                 110

Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
        115                 120                 125

Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
    130                 135                 140

Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
145                 150                 155                 160

Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
                165                 170                 175

Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly
            180                 185                 190

Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
        195                 200                 205

Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
    210                 215                 220

Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp
225                 230                 235                 240

Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
                245                 250                 255

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr
            260                 265                 270

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

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

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

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

Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
            340                 345                 350

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

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

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
385                 390                 395                 400

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
                405                 410                 415

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
            420                 425                 430

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
        435                 440                 445

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
    450                 455                 460

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
465                 470                 475                 480

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
                485                 490
```

<210> 10

<211> 1485

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anti-BCMA02 CAR

atggcactcc ccgtcaccgc ccttctcttg cccctcgccc tgctgctgca tgctgccagg 60

cccgacattg tgctcactca gtcacctccc agcctggcca tgagcctggg aaaaagggcc 120

accatctcct gtagagccag tgagtccgtc acaatcttgg ggagccatct tattcactgg 180

<400> 10 tatcagcaga agccccgggca gcctccaacc cttcttattc agctcgcgtc aaacgtccag 240

acgggtgtac ctgccagatt ttctggtagc gggtcccgca ctgattttac actgaccata 300

gatccagtgg aagaagacga tgtggccgtg tattattgtc tgcagagcag aacgattcct 360

cgcacatttg gtgggggtac taagctggag attaagggaa gcacgtccgg ctcagggaag 420

ccgggctccg gcgagggaag cacgaagggg caaattcagc tggtccagag cggacctgag 480

ctgaaaaaac ccggcgagac tgttaagatc agttgtaaag catctggcta taccttcacc 540

gactacagca taaattgggt gaaacgggcc cctggaaagg gcctcaaatg gatgggttgg 600

atcaataccg aaactaggga gcctgcttat gcatatgact tccgcgggag attcgccttt 660

tcactcgaga catctgcctc tactgcttac ctccaaataa acaacctcaa gtatgaagat 720

acagccactt acttttgcgc cctcgactat agttacgcca tggactactg gggacaggga 780

acctccgtta ccgtcagttc cgcggccgca accacaacac ctgctccaag gccccccaca 840

cccgctccaa ctatagccag ccaaccattg agcctcagac ctgaagcttg caggcccgca 900

gcaggaggcg ccgtccatac gcgaggcctg gacttcgcgt gtgatattta tatttgggcc 960

cctttggccg gaacatgtgg ggtgttgctt ctctcccttg tgatcactct gtattgtaag 1020

cgcgggagaa agaagctcct gtacatcttc aagcagcctt ttatgcgacc tgtgcaaacc 1080

actcaggaag aagatgggtg ttcatgccgc ttccccgagg aggaagaagg agggtgtgaa 1140

ctgagggtga aattttctag aagcgccgat gctcccgcat atcagcaggg tcagaatcag 1200

ctctacaatg aattgaatct cggcaggcga gaagagtacg atgttctgga caagagacgg 1260

ggcagggatc ccgagatggg gggaaagccc cggagaaaaa atcctcagga ggggttgtac 1320

aatgagctgc agaaggacaa gatggctgaa gcctatagcg agatcggaat gaaaggcgaa 1380

agacgcagag gcaaggggca tgacggtctg taccagggtc tctctacagc caccaaggac 1440

acttatgatg cgttgcatat gcaagccttg ccaccccgct aatga 1485

<210> 11

<211> 184

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>11

```
Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
1               5                  10                  15

Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr
            20                  25                  30

Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
        35                  40                  45

Val Lys Gly Thr Asn Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu
    50                  55                  60

Ile Ile Ser Leu Ala Val Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile
65                  70                  75                  80

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

Leu Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu
            100                 105                 110

Ile Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys
        115                 120                 125

Glu Asp Cys Ile Lys Ser Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe
    130                 135                 140

Pro Leu Pro Ala Met Glu Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys
145                 150                 155                 160

Thr Asn Asp Tyr Cys Lys Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu
                165                 170                 175

Ile Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg
            180
```

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Enlazante peptídico flexible

<400> 12

Asp Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Enlazante peptídico flexible

<400> 13

Thr Gly Glu Lys Pro
1 5

<210> 14

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Enlazante peptídico flexible

<400> 14

Gly Gly Arg Arg
1

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Enlazante peptídico flexible

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223>Enlazante peptídico flexible

<400> 16

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp
1 5 10

<210> 17

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Enlazante peptídico flexible

<400> 17

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

Leu Asp

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Enlazante peptídico flexible

<400> 18

Gly Gly Arg Arg Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Enlazante peptídico flexible

<400> 19

Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro
1 5

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Enlazante peptídico flexible

<400> 20

Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro
1 5 10

<210> 21

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Enlazante peptídico flexible

<400> 21

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

<210> 22

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Enlazante peptídico flexible

<400> 22

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de escisión de proteasa

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS

<222> (2)..(3)

<223> Xaa = cualquier aminoácido<220>

<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS

<222> (5)..(5)

<223>Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS

<222> (7)..(7)

<223> Xaa es Gly o Ser

<400> 23

Glu Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Xaa
1 5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de escisión de proteasa

<400> 24

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
1 5

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de escisión de proteasa

<400> 25

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser

1 5

<210> 26

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de escisión de proteasa

<400> 26

Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn
1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 27

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de escisión de proteasa

<400> 27

Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn
1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de escisión de proteasa

<400> 28

Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
1 5 10

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de escisión de proteasa

<400> 29

Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly
1 5 10 15

Pro

<210> 30

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de escisión de proteasa

<400> 30

Gln Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser
1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro
20

<210> 31

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de escisión de proteasa

<400> 31

Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly
1 5 10 15

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20

<210> 32

<211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de escisión de proteasa

<400> 32

Val Thr Glu Leu Leu Tyr Arg Met Lys Arg Ala Glu Thr Tyr Cys Pro
1 5 10 15

Arg Pro Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys
20 25 30

Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr
35 40

<210> 33

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223>sitio de escisión de proteasa

<400> 33

Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro
1 5 10 15

Gly Pro

<210> 34

<211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de escisión de proteasa

<400> 34

Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val
1 5 10 15

Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly
20 25 30

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
35 40

<210> 35

<211> 33

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sitio de escisión de proteasa

<400> 35

Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu
1 5 10 15

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

Pro

<210> 36

<211> 7350

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vector CAR anti-BCMA02

<400> 36

tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca 60

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120

ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180

accatcatat gccagcctat ggtgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 240

tacggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 300

tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 360

tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 420

aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt 480

caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 540

tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtgatgc ggttttggca 600

gtacatcaat gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat 660

tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa 720

caactccgcc ccattgacgc aaatgggcgg taggcgtgta cggtgggagg tctatataag 780

cagagctcgt ttagtgaacc gggtctctct ggttagacca gatctgagcc tgggagctct 840

ctggctaact agggaaccca ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgctcaaag 900

tagtgtgtgc ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag atccctcaga ccctttagt 960

cagtgtggaa aatctctagc agtggcgccc gaacagggac ttgaaagcga aagtaaagcc 1020

agaggagatc tctcgacgca ggactcggct tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg 1080

gcggcgactg gtgagtacgc caaaaatttt gactagcgga ggctagaagg agagagtagg 1140

gtgcgagagc gtcggtatta agcgggggag aattagataa atgggaaaaa attcggttaa 1200

ggccaggggg aaagaaacaa tataaactaa aacatatagt tagggcaagc agggagctag 1260

aacgattcgc agttaatcct ggccttttag agacatcaga aggctgtaga caaatactgg 1320

gacagctaca accatcccct cagacaggat cagaagaact tagatcatta tataatacaa 1380

tagcagtcct ctattgtgtg catcaaagga tagatgtaaa agacaccaag gaagccttag 1440

ataagataga ggaagagcaa aacaaaagta agaaaaaggc acagcaagca gcagctgaca 1500

caggaaacaa cagccaggtc agccaaaatt accctatagt gcagaacctc caggggcaaa 1560

tggtacatca ggccatatca cctagaactt taaattaaga cagcagtaca aatggcagta 1620

ttcatccaca attttaaaag aaaaggggag attgggggt acagtgcagg ggaaagaata 1680

gtagacataa tagcaacaga catacaaact aaagaattac aaaaacaaat tacaaaaatt 1740

caaaattttc gggtttatta cagggacagc agagatccag tttggaaagg accagcaaag 1800

ctcctctgga aaggtgaagg ggcagtagta atacaagata atagtgacat aaaagtagtg 1860

ccaagaagaa aagcaaagat catcagggat tatggaaaac agatggcagg tgatgattgt 1920

gtggcaagta gacaggatga ggattaacac atggaaaaga ttagtaaaac accatagctc 1980

tagagcgatc ccgatcttca gacctggagg aggagatatg agggacaatt ggagaagtga 2040

attatataaa tataaagtag taaaaattga accattagga gtagcaccca ccaaggcaaa 2100

gagaagagtg gtgcagagag aaaaaagagc agtgggaata ggagctttgt tccttgggtt 2160

cttgggagca gcaggaagca ctatgggcgc agcgtcaatg acgctgacgg tacaggccag 2220

acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaatttg ctgagggcta ttgaggcgca 2280

acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag ctccaggcaa gaatcctggc 2340

tgtggaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttgct ctggaaaact 2400

catttgcacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc tggaacagat 2460

ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca caagcttggt 2520

aggtttaaga atagtttttg ctgtactttc tatagtgaat agagttaggc agggatattc 2580

accattatcg tttcagaccc acctcccaac cccgagggga cccgacaggc ccgaaggaat 2640

agaagaagaa ggtggagaga gagacagaga cagatccatt cgattagtga acggatccat 2700

ctcgacggaa tgaaagaccc cacctgtagg tttggcaagc taggatcaag gttaggaaca 2760

gagagacagc agaatatggg ccaaacagga tatctgtggt aagcagttcc tgccccggct 2820

cagggccaag aacagttgga acagcagaat atgggccaaa caggatatct gtggtaagca 2880

gttcctgccc cggctcaggg ccaagaacag atggtcccca gatgcggtcc cgccctcagc 2940

agtttctaga gaaccatcag atgtttccag ggtgccccaa ggacctgaaa tgaccctgtg 3000

ccttatttga actaaccaat cagttcgctt ctcgcttctg ttcgcgcgct tctgctcccc 3060

gagctcaata aaagagccca caacccctca ctcggcgcga ttcacctgac gcgtctacgc 3120

caccatggca ctccccgtca ccgcccttct cttgcccctc gccctgctgc tgcatgctgc 3180

caggccccgac attgtgctca ctcagtcacc tcccagcctg gccatgagcc tgggaaaaag 3240

ggccaccatc tcctgtagag ccagtgagtc cgtcacaatc ttggggagcc atcttattca 3300

ctggtatcag cagaagcccg ggcagcctcc aacccttctt attcagctcg cgtcaaacgt 3360

ccagacgggt gtacctgcca gattttctgg tagcgggtcc cgcactgatt ttacactgac 3420

catagatcca gtggaagaag acgatgtggc cgtgtattat tgtctgcaga gcagaacgat 3480

tcctcgcaca tttggtgggg gtactaagct ggagattaag ggaagcacgt ccggctcagg 3540

gaagccgggc tccggcgagg gaagcacgaa ggggcaaatt cagctggtcc agagcggacc 3600

tgagctgaaa aaacccggcg agactgttaa gatcagttgt aaagcatctg gctatacctt 3660

caccgactac agcataaatt gggtgaaacg ggcccctgga aagggcctca aatggatggg 3720

ttggatcaat accgaaacta gggagcctgc ttatgcatat gacttccgcg ggagattcgc 3780

cttttcactc gagacatctg cctctactgc ttacctccaa ataaacaacc tcaagtatga 3840

agatacagcc acttactttt gcgccctcga ctatagttac gccatggact actggggaca 3900

gggaacctcc gttaccgtca gttccgcggc cgcaaccaca acacctgctc caaggccccc 3960

cacacccgct ccaactatag ccagccaacc attgagcctc agacctgaag cttgcaggcc 4020

cgcagcagga ggcgccgtcc atacgcgagg cctggacttc gcgtgtgata tttatatttg 4080

ggcccctttg gccggaacat gtggggtgtt gcttctctcc cttgtgatca ctctgtattg 4140

taagcgcggg agaaagaagc tcctgtacat cttcaagcag ccttttatgc gacctgtgca 4200

aaccactcag gaagaagatg ggtgttcatg ccgcttcccc gaggaggaag aaggagggtg 4260

tgaactgagg gtgaaatttt ctagaagcgc cgatgctccc gcatatcagc agggtcagaa 4320

tcagctctac aatgaattga atctcggcag gcgagaagag tacgatgttc tggacaagag 4380

acggggcagg gatcccgaga tgggggggaaa gccccggaga aaaaatcctc aggaggggtt 4440

gtacaatgag ctgcagaagg acaagatggc tgaagcctat agcgagatcg gaatgaaagg 4500

cgaaagacgc agaggcaagg ggcatgacgg tctgtaccag ggtctctcta cagccaccaa 4560

ggacacttat gatgcgttgc atatgcaagc cttgccaccc cgctaatgac aggtaccttt 4620

aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaaag aaaaggggggg 4680

actggaaggg ctaattcact cccaaagaag acaagatctg ctttttgcct gtactgggtc 4740

tctctggtta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactaggga acccactgct 4800

taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgct tcaatgtgtg tgttggtttt ttgtgtgtcg 4860

aaattctagc gattctagct tggcgtaatc atggtcatag ctgtttcctg tgtgaaattg 4920

ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc ataaagtgta aagcctgggg 4980

tgcctaatga gtgagctaac tcacattaat tgcgttgcgc tcactgcccg ctttccagtc 5040

gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt 5100

gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct 5160

gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga 5220

taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc 5280

cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg ccccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg 5340

ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttcccctgg 5400

aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt 5460

tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggt 5520

gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg 5580

cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caacccggta agacacgact tatcgccact 5640

ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt 5700

cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggta tctgcgctct 5760

gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac 5820

cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc 5880

tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg 5940

ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta 6000

aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttggtctg acagttacca 6060

atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc 6120

ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc 6180

tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc 6240

agccggaagg gccgagcgca gaagtggtcc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat 6300

taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt 6360

tgccattgct acaggcatcg tggtgtcacg ctcgtcgttt ggtatggctt cattcagctc 6420

cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atcccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag 6480

ctccttcggt cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggt 6540

tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac 6600

tggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg 6660

cccggcgtca atacgggata ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat 6720

tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc 6780

gatgtaaccc actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc 6840

tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa 6900

atgttgaata ctcatactct tccttttttca atattattga agcatttatc agggttattg 6960

tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg 7020

cacatttccc cgaaaagtgc cacctgggac tagcttttg caaaagccta ggcctccaaa 7080

aaagcctcct cactacttct ggaatagctc agaggccgag gcggcctcgg cctctgcata 7140

aataaaaaaa attagtcagc catggggcgg agaatgggcg gaactgggcg gagttagggg 7200

cgggatgggc ggagttaggg gcgggactat ggttgctgac taattgagat gagcttgcat 7260

gccgacattg attattgact agtccctaag aaaccattct tatcatgaca ttaacctata 7320

aaaataggcg tatcacgagg ccctttcgtc 7350

**REIVINDICACIONES**

1. Un polinucleótido que codifica un CAR, en donde la secuencia de polinucleótidos se expone en la SEQ ID NO: 10.

2. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 1.

3. El vector de la reivindicación 2, en donde el vector es un vector de expresión, un vector episomal, un vector viral, un vector retroviral o un vector lentiviral.

4. El vector de la reivindicación 2, en donde el vector lentiviral se selecciona del grupo que consiste esencialmente en: virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1); virus de inmunodeficiencia humana 2 (VIH-2), virus visna-maedi (VMV); virus de artritis-encefalitis caprina (CAEV); virus de la anemia infecciosa equina (EIAV); virus de inmunodeficiencia felina (FIV); virus de inmunodeficiencia bovina (BIV); y virus de inmunodeficiencia en simios (SIV).

5. El vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, que comprende un LTR retroviral izquierdo (5'), una señal de empaquetamiento Psi (Ψ), un FLAP de ADN/tracto de polipurina central (cPPT/FLAP), un elemento de exportación retroviral; un promotor unido operativamente al polinucleótido; y un LTR retroviral derecho (3').

6. El vector de la reivindicación 5, que comprende además una secuencia de poliadenilación heteróloga.

7. El vector de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en donde el promotor del 5' LTR se reemplaza con un promotor heterólogo.

8. El vector de la reivindicación 7, en donde el promotor heterólogo es un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV) o un promotor del virus de simio 40 (SV40).

9. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde el 5' LTR o 3' LTR es un LTR de lentivirus.

10. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde el 3' LTR es un LTR autoinactivador (SIN).

11. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en donde la secuencia de poliadenilación es una secuencia de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina o señal de poliadenilación de β-globina de conejo.

12. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en donde el promotor unido operativamente al polinucleótido de la reivindicación 1 se selecciona del grupo que consiste en: un promotor del gen temprano inmediato (CMV) de citomegalovirus, un promotor alfa del factor de alargamiento 1 (EF1-α), un promotor de fosfoglicerato quinasa-1 (PGK), un promotor de ubiquitina-C (UBQ-C), un potenciador de citomegalovirus/promotor de beta-actina de pollo (CAG), potenciador de polioma/promotor de timidina quinasa de herpes simple (MC1), un promotor de beta actina (β-ACT), un promotor del virus de simio 40 (SV40) y un potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo, región de control negativo eliminada, promotor del sitio de unión al cebador dl587rev sustituido (MND).

13. Una célula efectora inmune ex vivo o in vitro que comprende el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12.

14. La célula efectora inmune ex vivo o in vitro de la reivindicación 13, en donde la célula efectora inmune se selecciona del grupo que consiste en: un linfocito T y una célula asesina natural (NK).

15. Una composición que comprende la célula efectora inmune ex vivo o in vitro de la reivindicación 13 o la reivindicación 14 y un excipiente fisiológicamente aceptable.

pBB-BCMA02
MND
SP
VL (C11D5.3)
218
enlazador
VH (C11D5.3)
CD8 bisagra
CD8 TM
4-1BB
CD3 ξ

*FIG. 1*

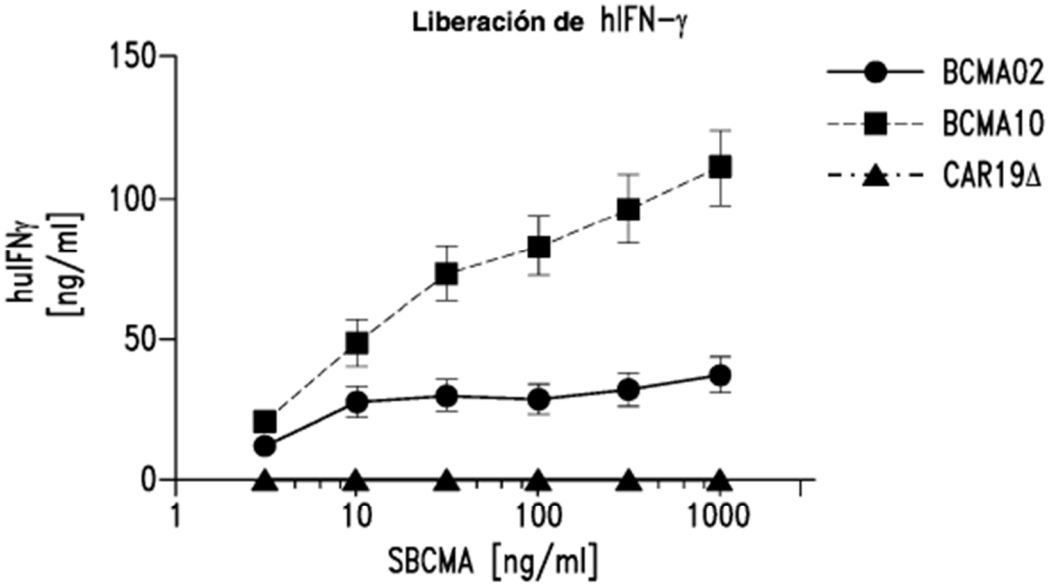
Liberación de hIFN-γ
150
100
50
0
huIFNγ [ng/ml]
1
10
100
1000
SBCMA [ng/ml]
BCMA02
BCMA10
CAR19Δ

*FIG. 2A*

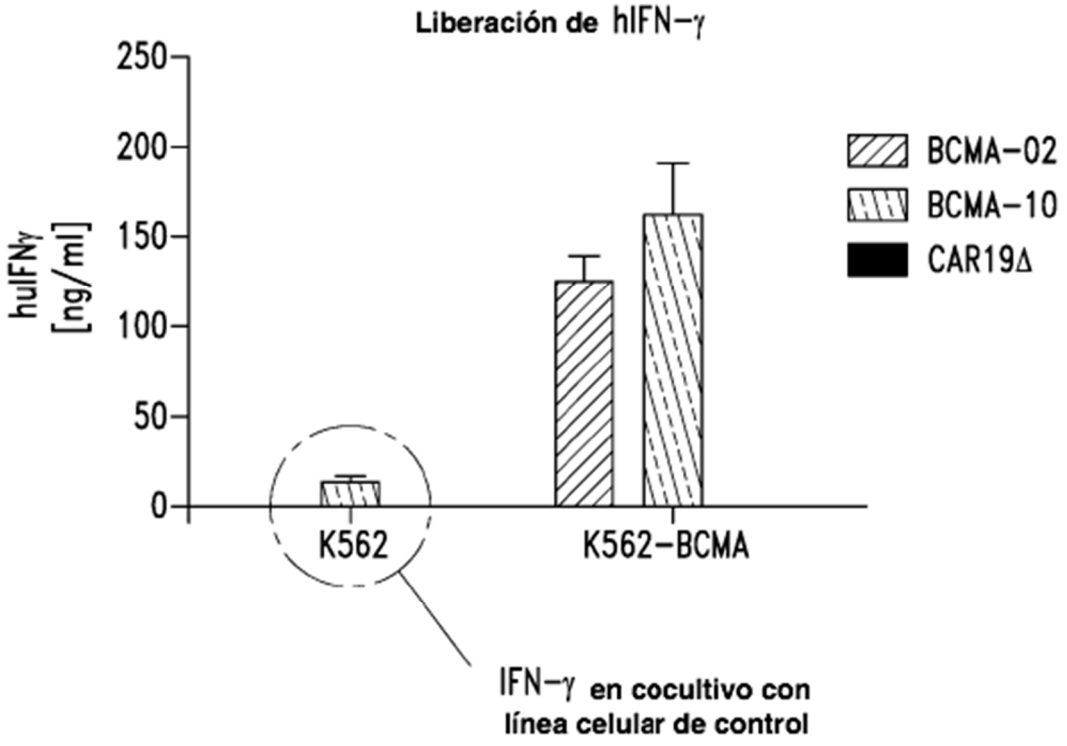
Liberación de hIFN-γ
250
200
150
100
50
0
huIFNγ [ng/ml]
BCMA-02
BCMA-10
CAR19Δ
K562
K562-BCMA
IFN-γ en cocultivo con línea celular de control

*FIG. 2B*

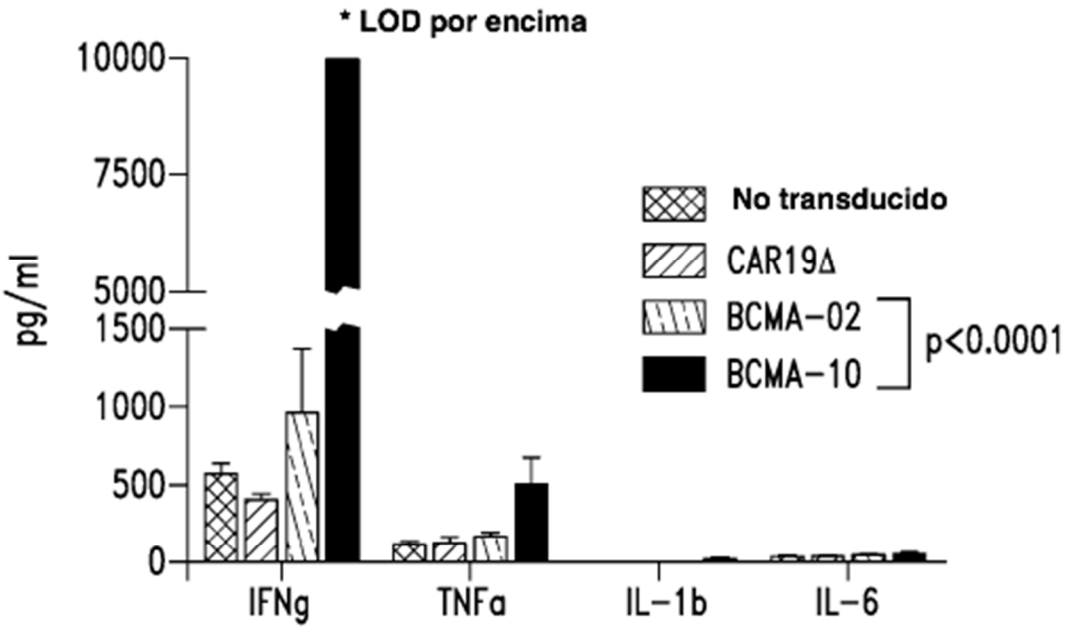
* LOD por encima
10000
7500
5000
1500
1000
500
0
pg/ml
No transducido
CAR19Δ
BCMA-02
BCMA-10
p<0.0001
IFNg
TNFa
IL-1b
IL-6

*FIG. 3*

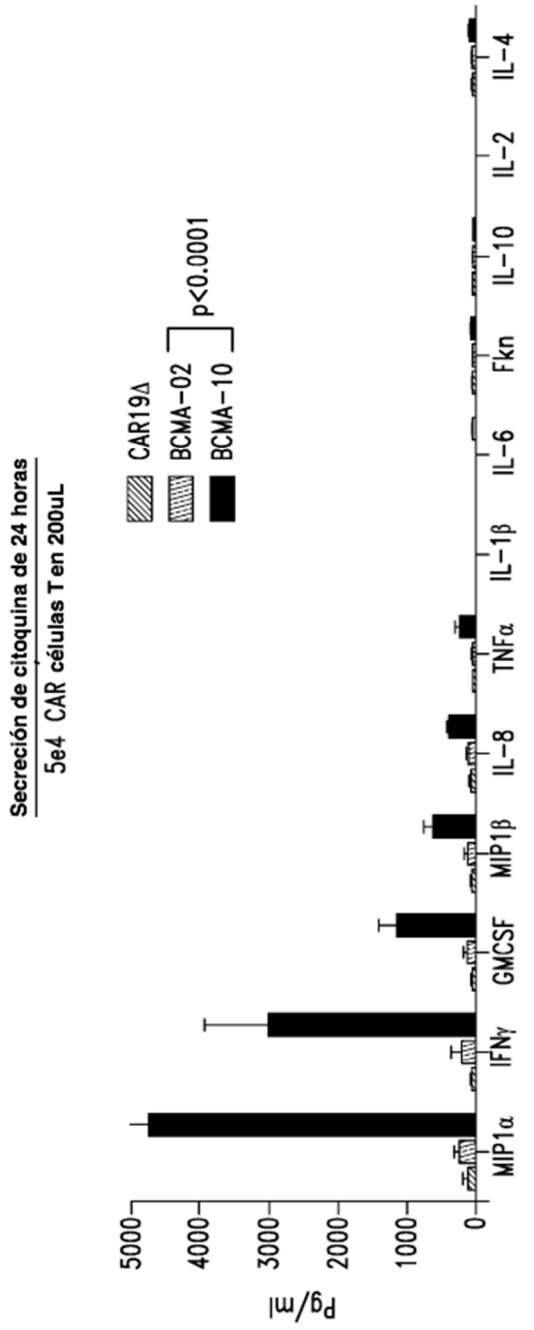
Secreción de citoquina de 24 horas
5e4 CAR células T en 200uL
CAR19Δ
BCMA-02
BCMA-10
p<0.0001
pg/ml
5000
4000
3000
2000
1000
0
MIP1α
IFNγ
GMCSF
MIP1β
IL-8
TNFα
IL-1β
IL-6
Fkn
IL-10
IL-2
IL-4

*FIG. 4*

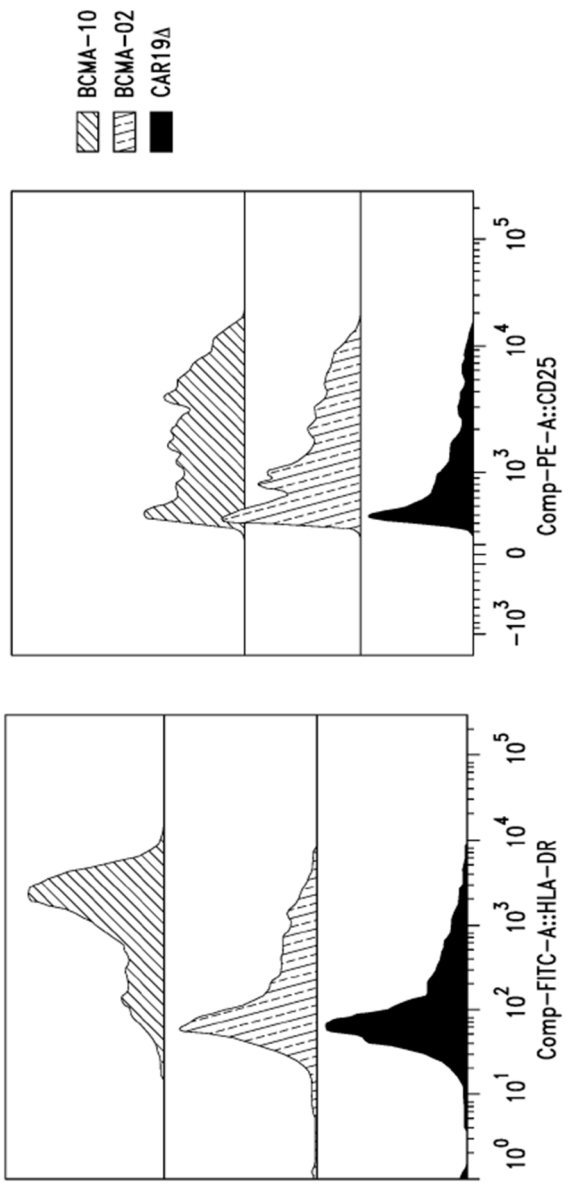
BCMA-10
BCMA-02
CAR19Δ
Comp-PE-A::CD25
CD25
Comp-FITC-A::HLA-DR
HLA-DR

*FIG. 5*

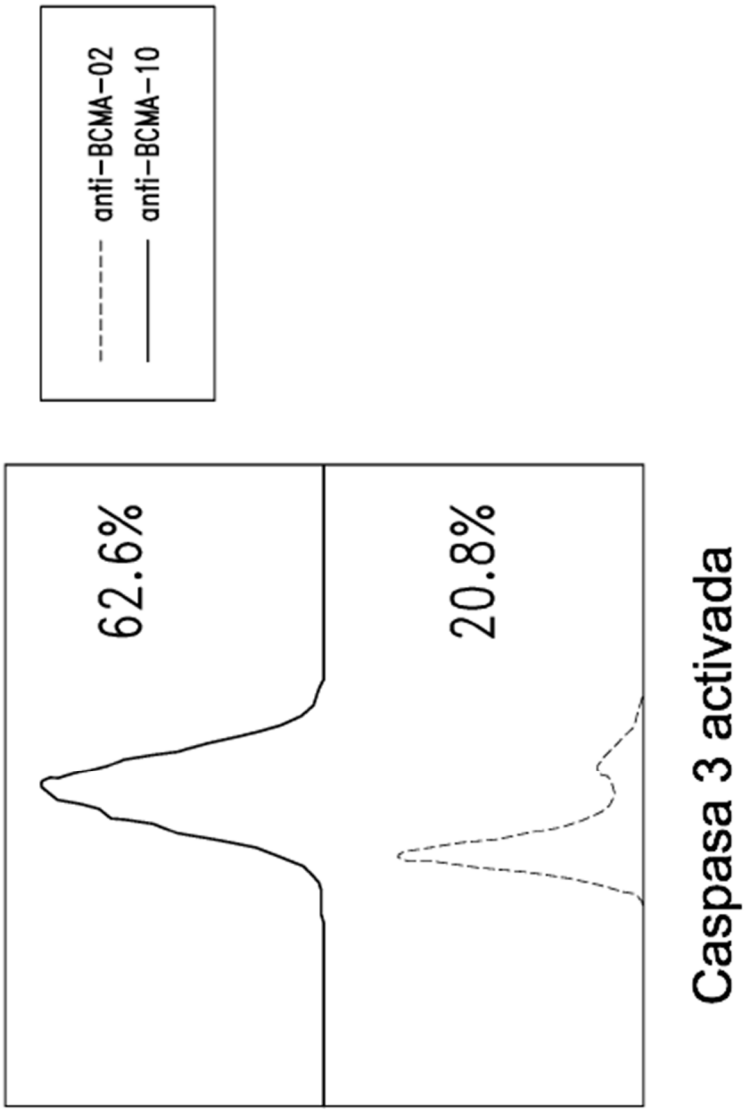


*FIG. 6*

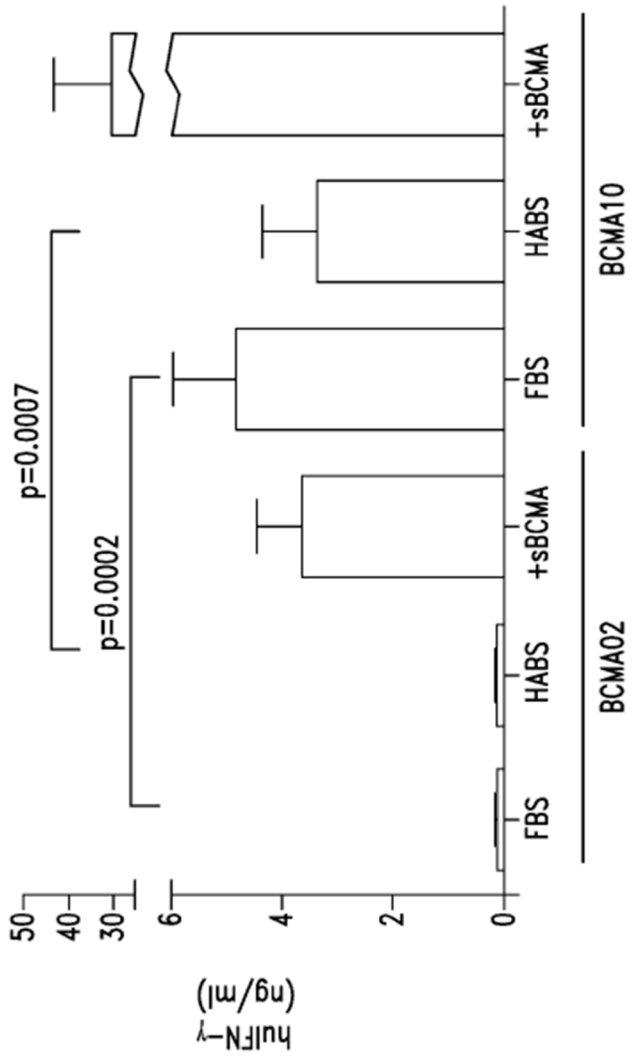
huIFN-γ (ng/ml)
50
40
30
6
4
2
0
p=0.0007
p=0.0002
FBS
HABS
+sBCMA
FBS
HABS
+sBCMA
BCMA02
BCMA10

*FIG. 7*

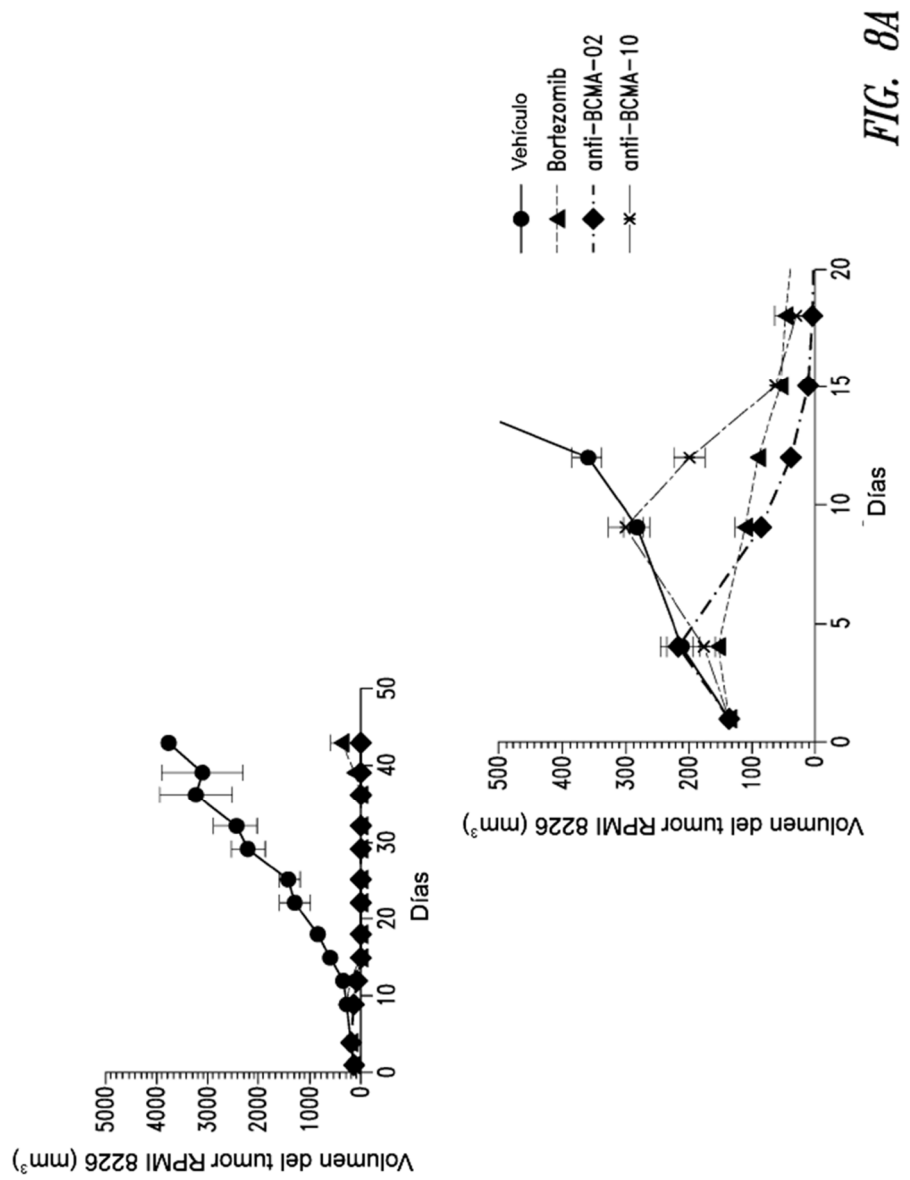
Volumen del tumor RPMI 8226 (mm³)
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
50
Días
Volumen del tumor RPMI 8226 (mm³)
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
Días
Vehículo
Bortezomib
anti-BCMA-02
anti-BCMA-10

*FIG. 8A*

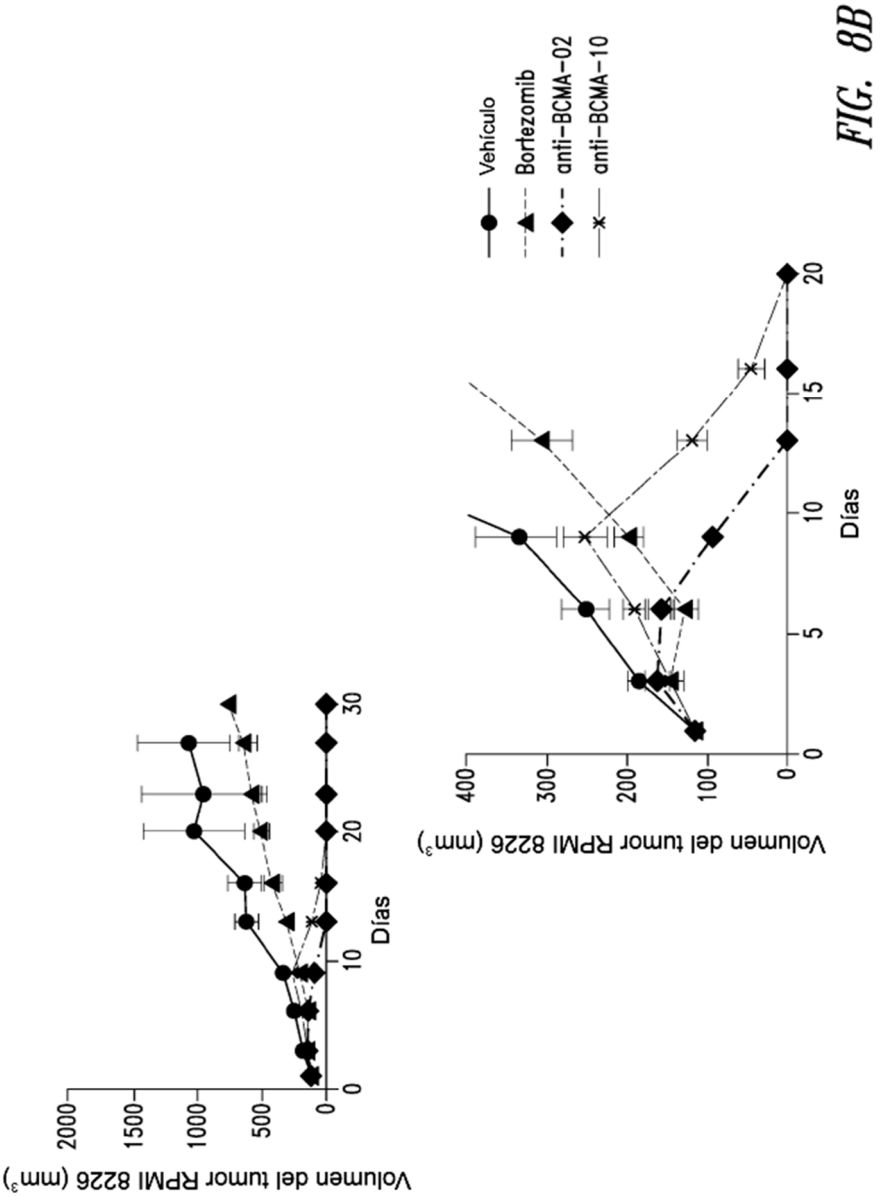
Vehículo
Bortezomib
anti-BCMA-02
anti-BCMA-10
Volumen del tumor RPMI 8226 (mm³)
Días
0
100
200
300
400
0
5
10
15
20
Volumen del tumor RPMI 8226 (mm³)
Días
0
500
1000
1500
2000
0
10
20
30

FIG. 8B

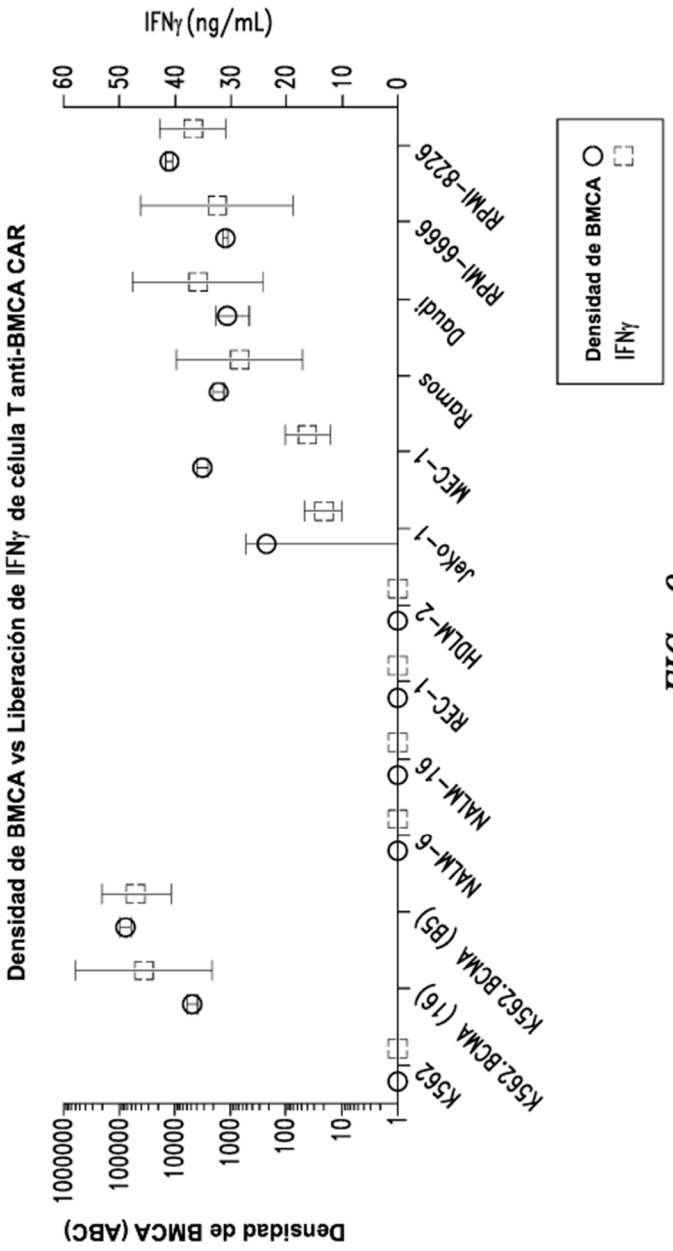
Densidad de BMCA vs Liberación de IFNγ de célula T anti-BMCA CAR
IFNγ (ng/mL)
Densidad de BMCA (ABC)
Densidad de BMCA
IFNγ
K562
K562.BCMA (16)
K562.BCMA (B5)
NALM-6
NALM-16
REC-1
HDLM-2
Jeko-1
MEC-1
Ramos
Daudi
RPMI-6666
RPMI-8226

FIG. 9

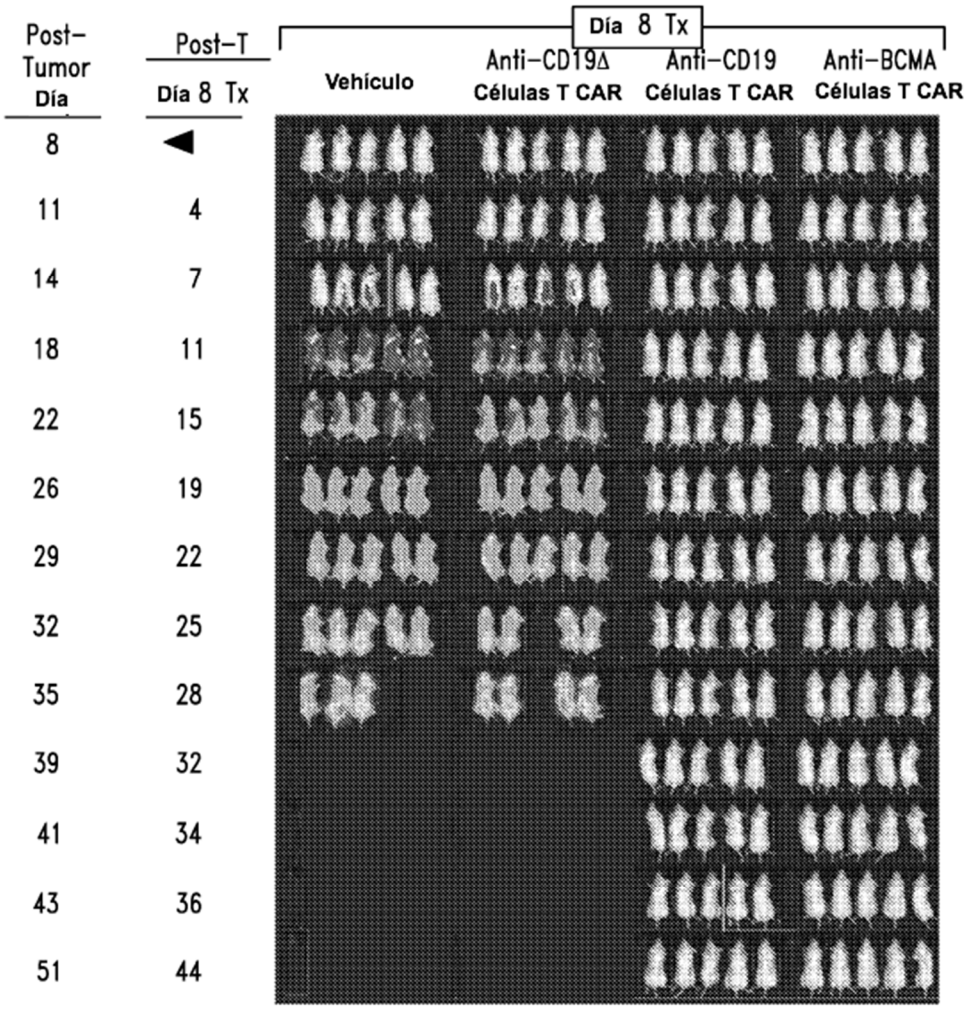
Post-Tumor Día
Post-T Día 8 Tx
Día 8 Tx
Vehículo
Anti-CD19Δ Células T CAR
Anti-CD19 Células T CAR
Anti-BCMA Células T CAR
8
11
14
18
22
26
29
32
35
39
41
43
51
4
7
11
15
19
22
25
28
32
34
36
44

*FIG. 10A*

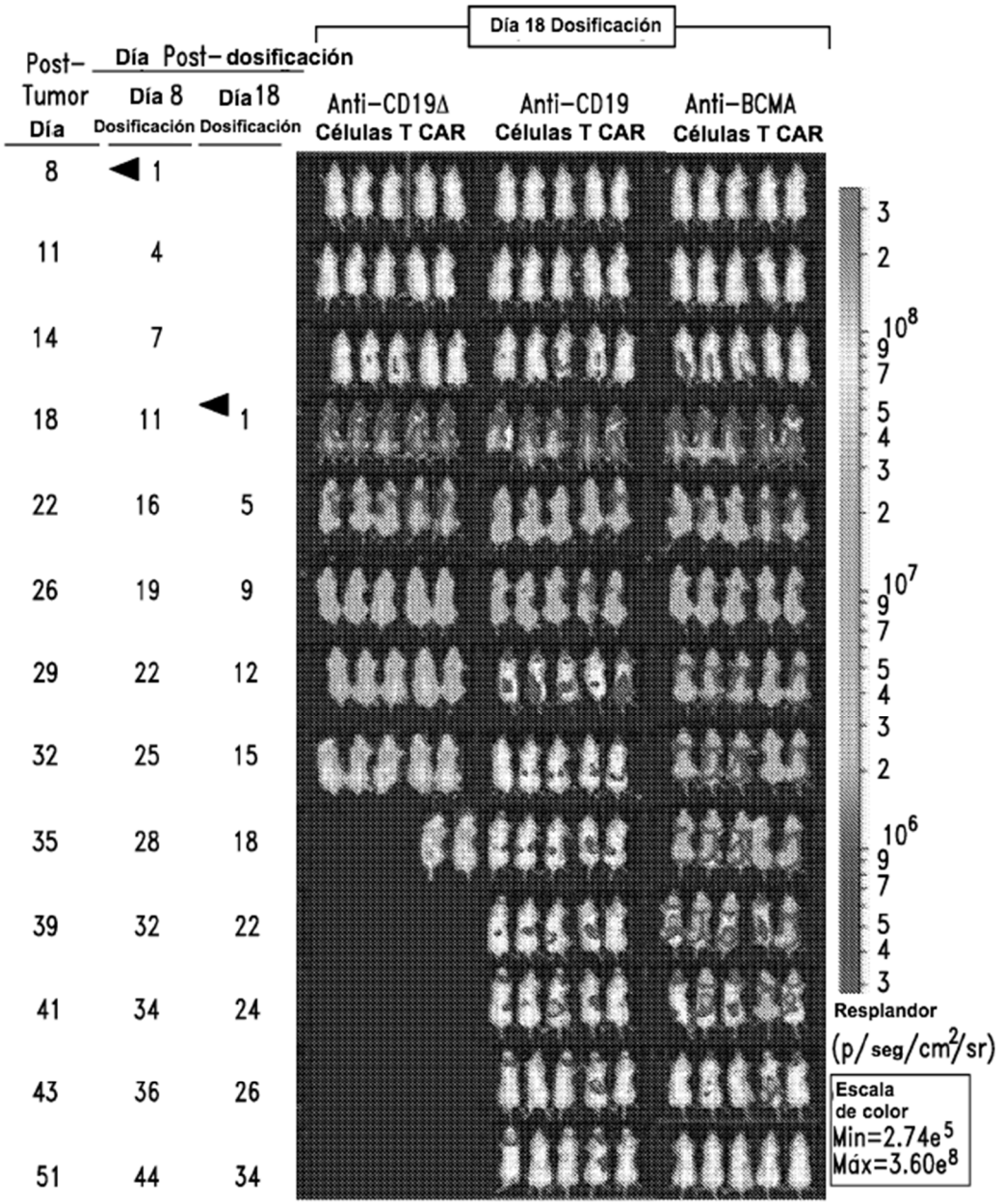
Día 18 Dosificación
Post-Tumor Día
Día Post-dosificación
Día 8 Dosificación
Día 18 Dosificación
Anti-CD19Δ Células T CAR
Anti-CD19 Células T CAR
Anti-BCMA Células T CAR
8 1
11 4
14 7
18 11 1
22 16 5
26 19 9
29 22 12
32 25 15
35 28 18
39 32 22
41 34 24
43 36 26
51 44 34
3 2 10^8 9 7 5 4 3 2 10^7 9 7 5 4 3 2 10^6 9 7 5 4 3
Resplandor (p/seg/cm²/sr)
Escala de color
Min=2.74e^5
Máx=3.60e^8

*FIG. 10B*

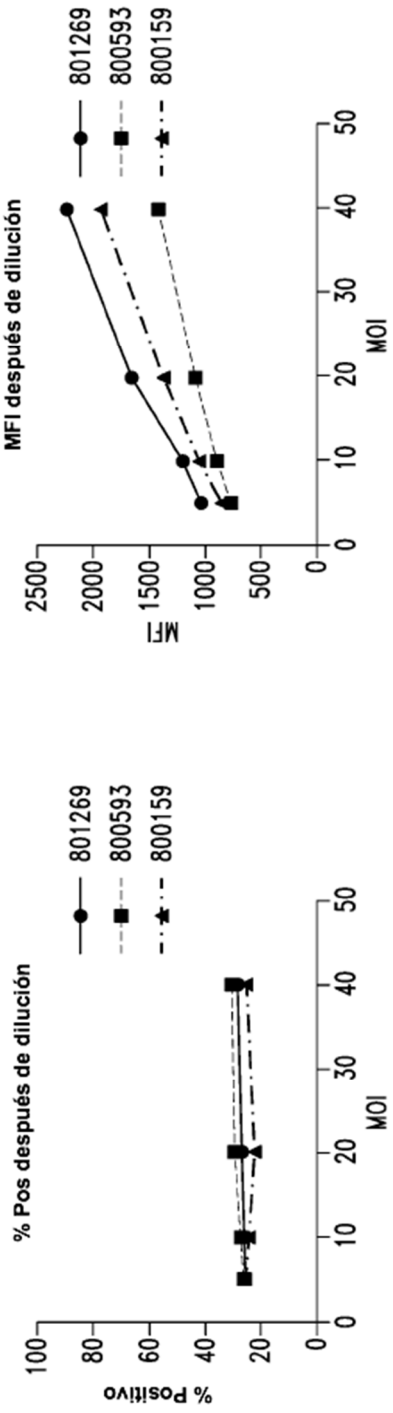


FIG. 11A




FIG. 11B

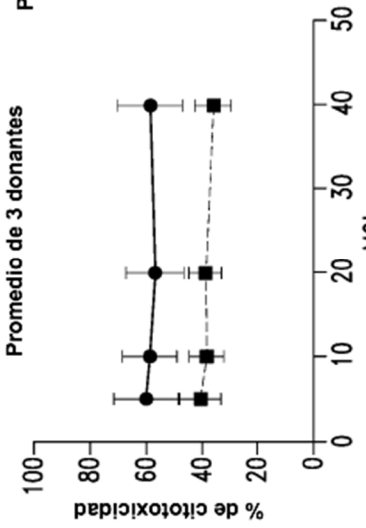


FIG. 11C

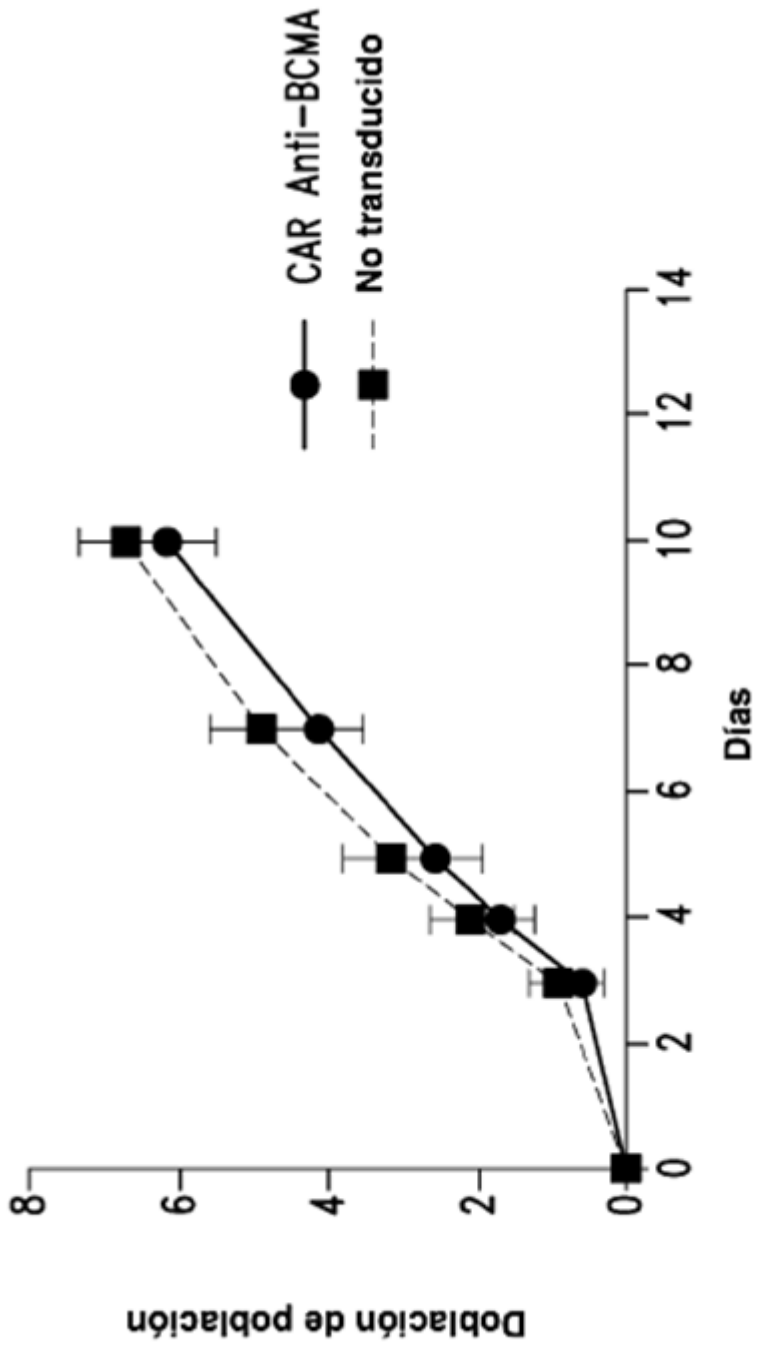
CAR Anti-BCMA
No transducido
Días
Población de población
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
12
14

FIG. 12A

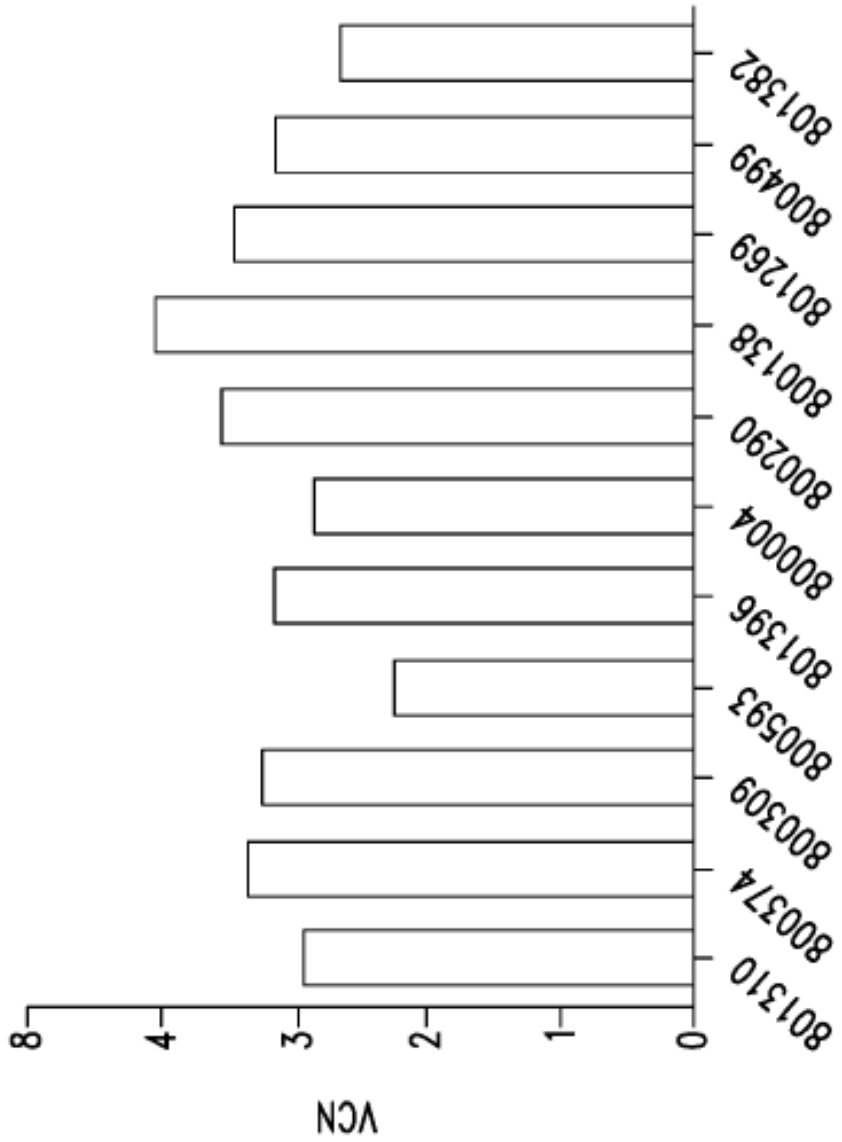
801310
800374
800309
800593
801396
800004
800290
800138
801269
800499
801382
0
1
2
3
4
8
VCN

FIG. 12B

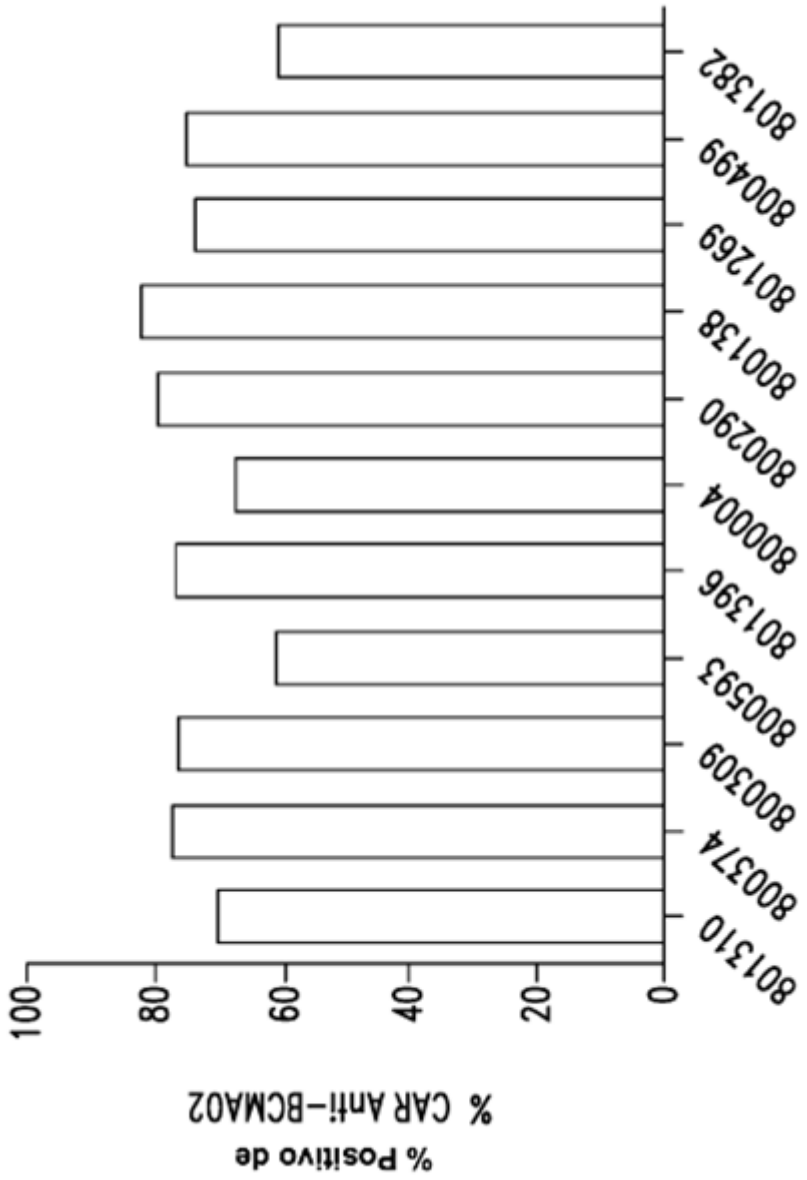
% Positivo de
% CAR Anti-BCMA02
100
80
60
40
20
0
801310
800374
800309
800593
801396
800004
800290
800138
801269
800499
801382

FIG. 12C

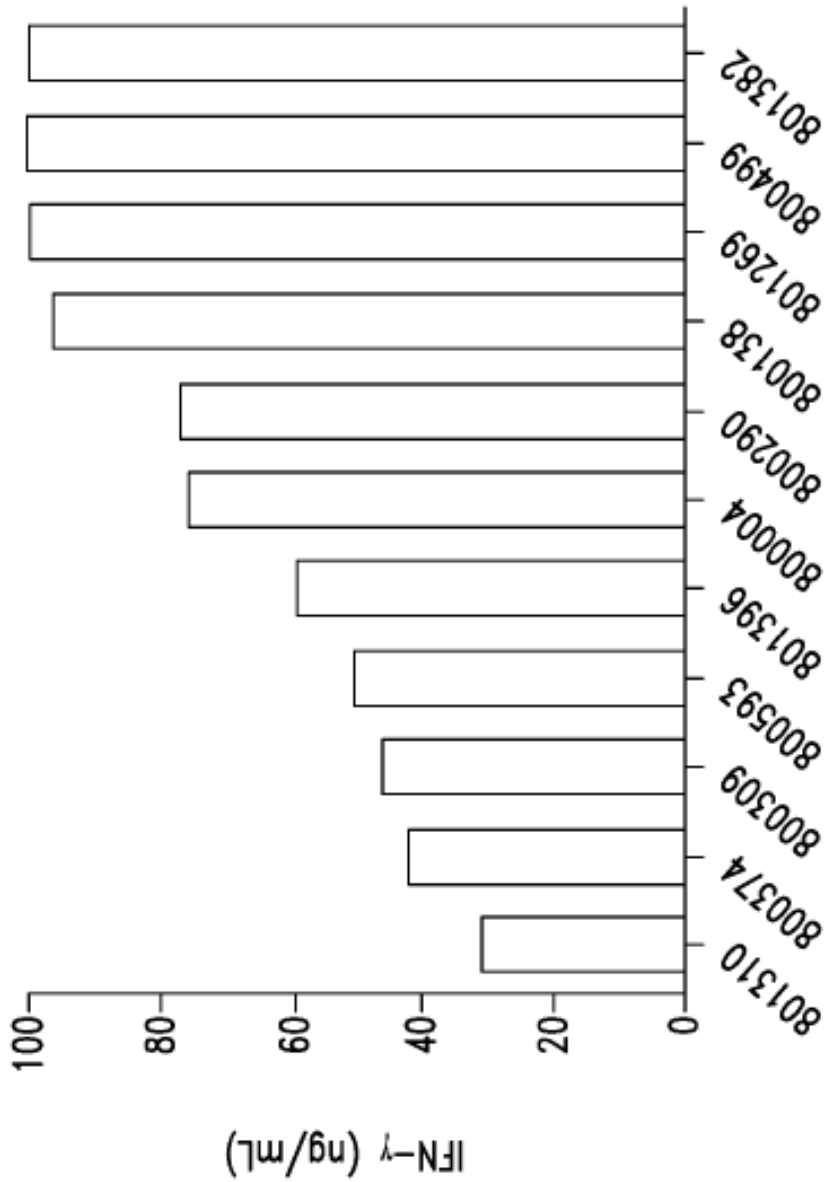
IFN-γ (ng/mL)
0
20
40
60
80
100
801310
800374
800309
800593
801396
800004
800290
800138
801269
800499
801382

FIG. 12D

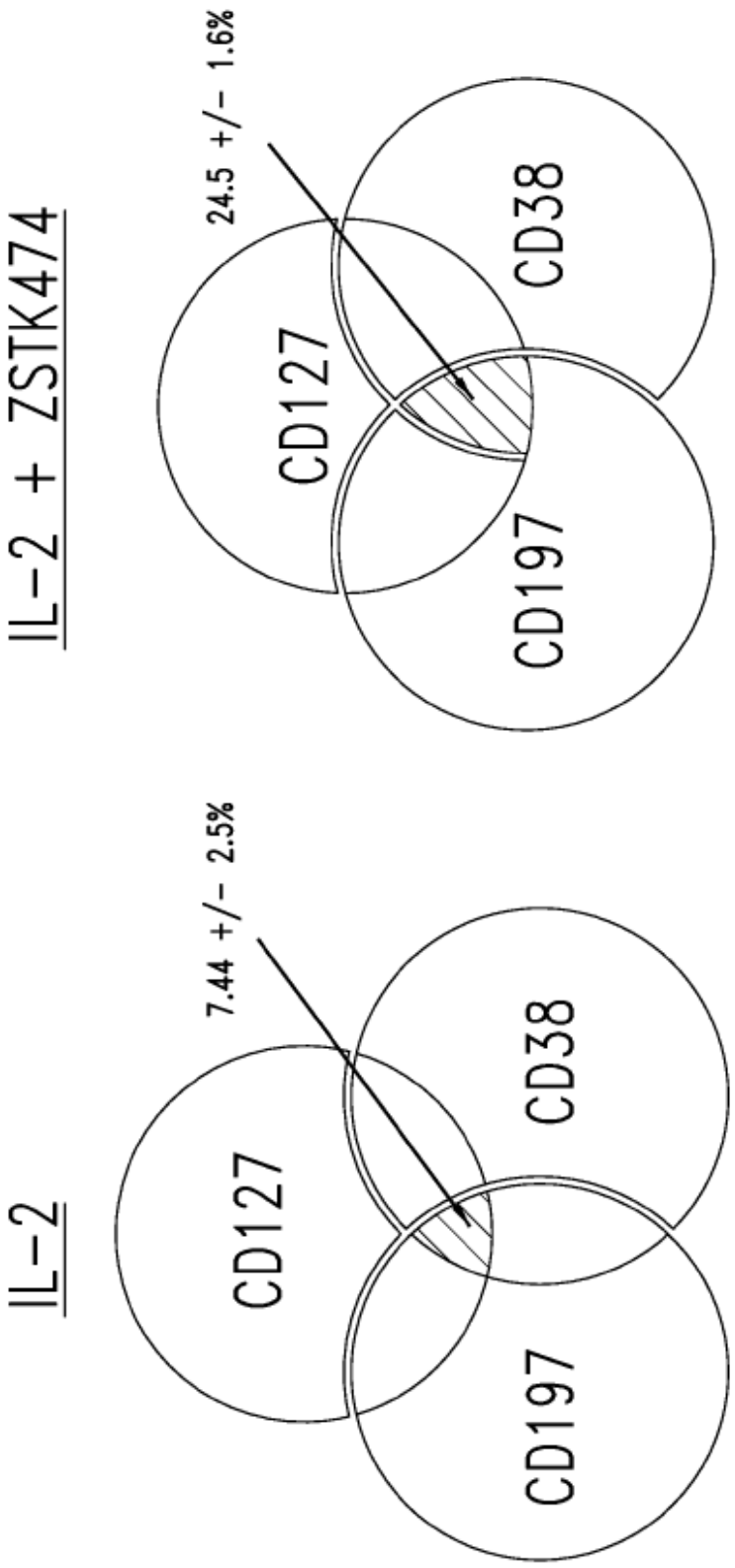
IL-2 + ZSTK474
24.5 +/- 1.6%
CD127
CD38
CD197
IL-2
7.44 +/- 2.5%
CD127
CD38
CD197

*FIG. 13*

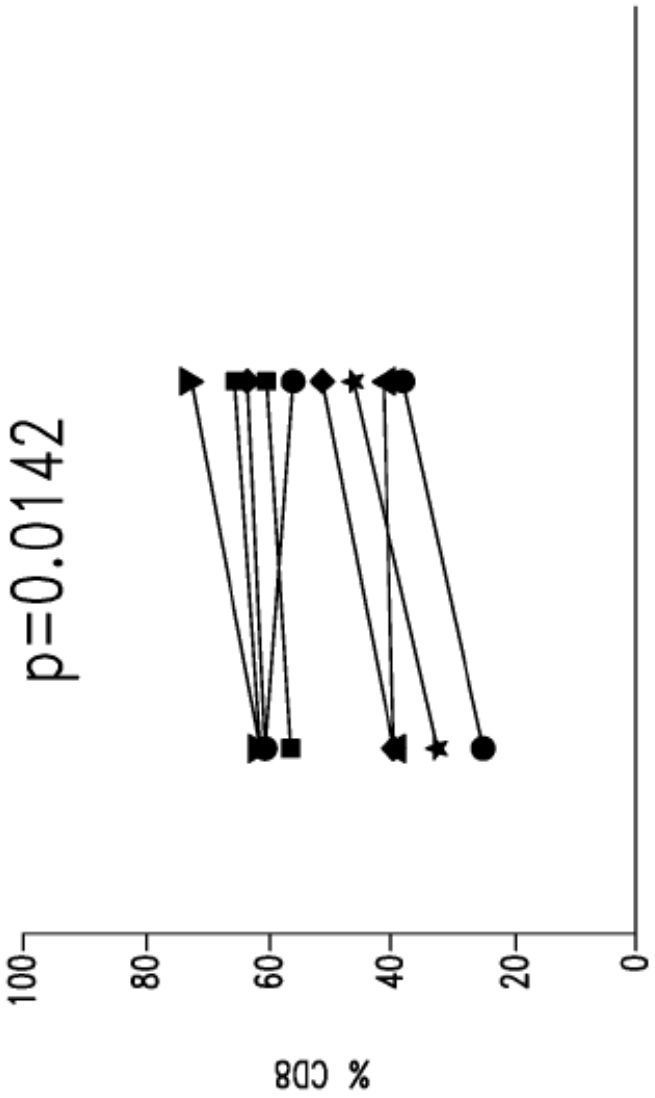


*FIG. 14*

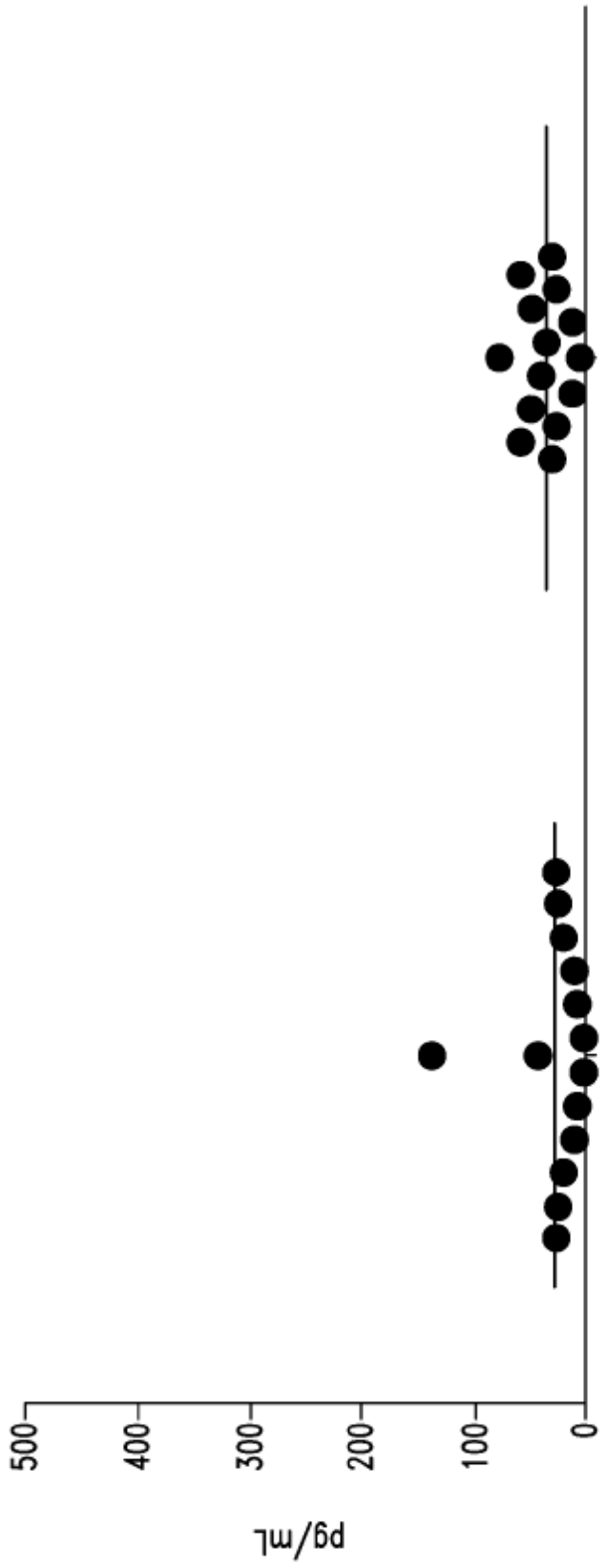


*FIG. 15*

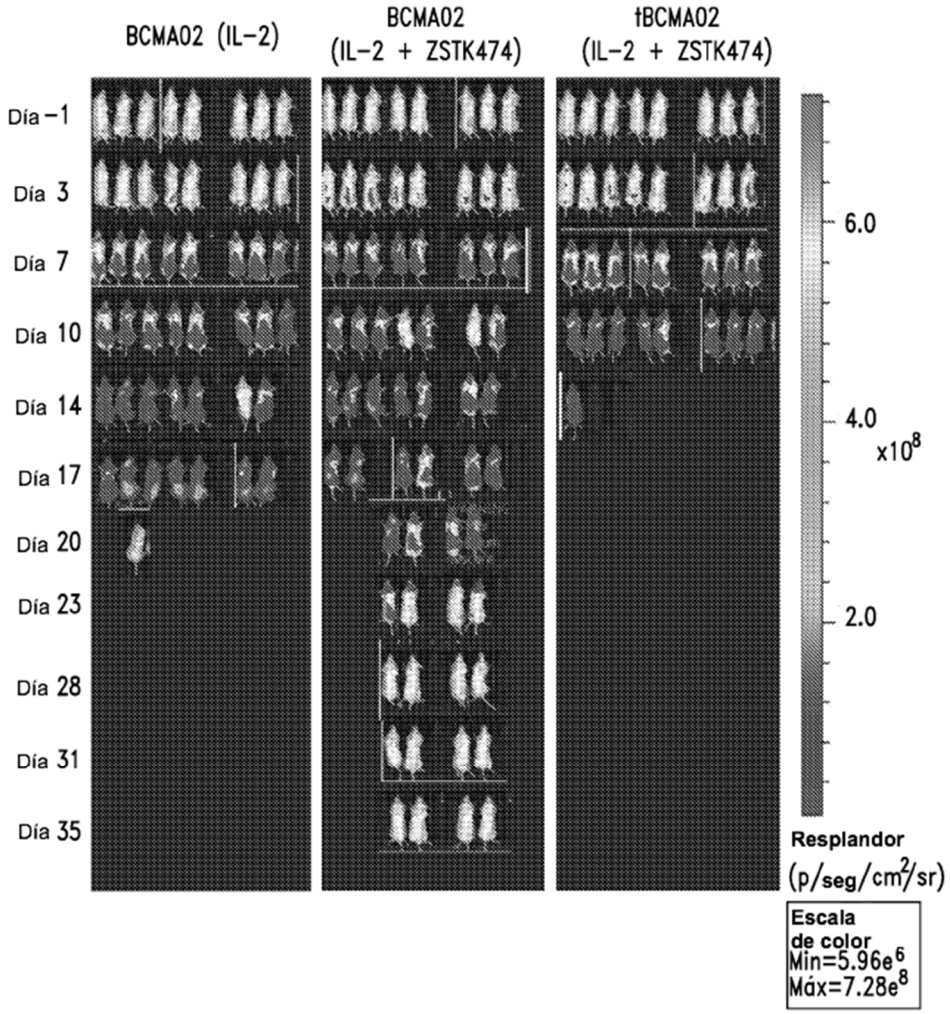
BCMA02 (IL-2)
BCMA02 (IL-2 + ZSTK474)
tBCMA02 (IL-2 + ZSTK474)
Día -1
Día 3
Día 7
Día 10
Día 14
Día 17
Día 20
Día 23
Día 28
Día 31
Día 35
6.0
4.0
x10^8
2.0
Resplandor
(p/seg/cm²/sr)
Escala de color
Min=5.96e^6
Máx=7.28e^8

*FIG. 16*

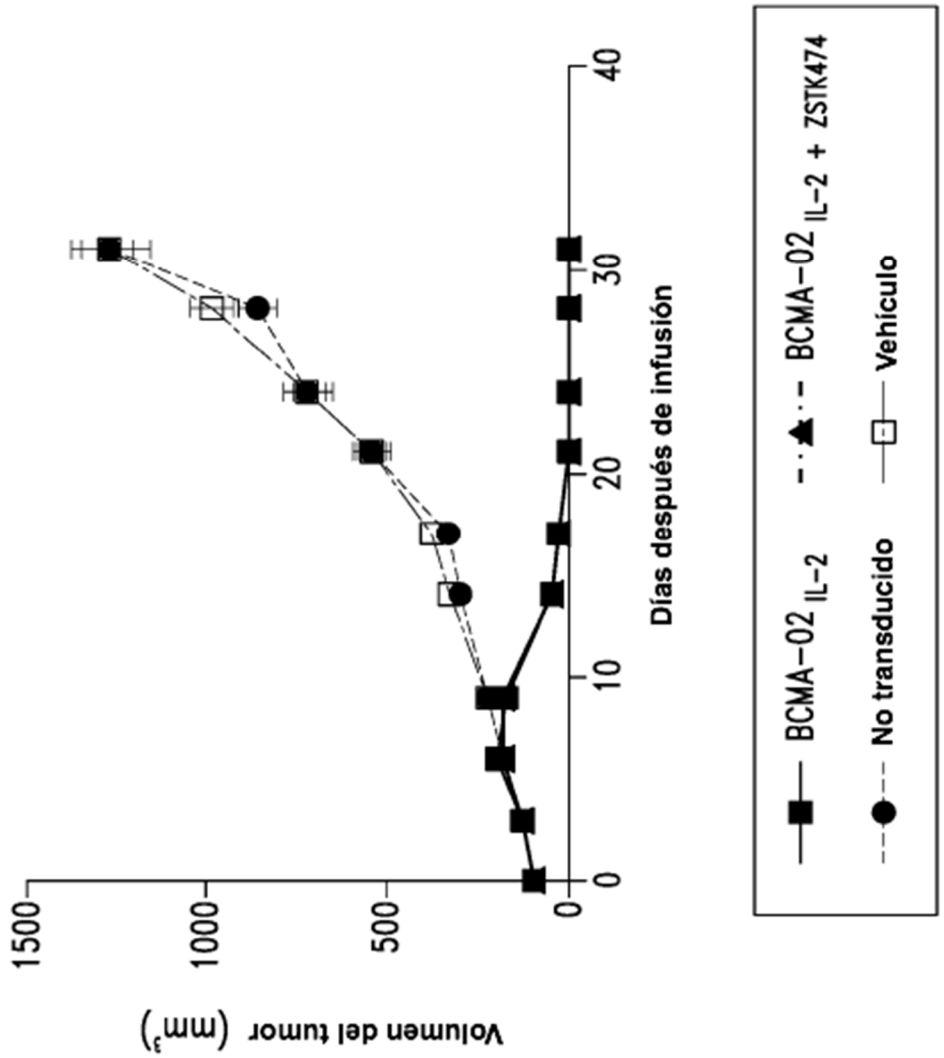
Volumen del tumor (mm³)
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
Días después de infusión
BCMA–02 IL–2
BCMA–02 IL–2 + ZSTK474
No transducido
Vehículo

*FIG. 17*