

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 805**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/54** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2017 PCT/EP2017/058873**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.10.2017 WO17178562**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2017 E 17723272 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 3414260**

54 Título: **Terapia de combinación que comprende una inmunocitocina inflamatoria y una célula T con receptor de antígeno quimérico (CAR)**

30 Prioridad:

**12.04.2016 GB 201606181**

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

**04.06.2020**

73 Titular/es:

**PHILOGEN S.P.A. (100.0%)**

**La Lizza 7**

**53100 Siena, IT**

72 Inventor/es:

**BERDEL, WOLFGANG;**

**ROSSIG, CLAUDIA;**

**SCHLIEMANN, CHRISTOPH;**

**ALTVATER, BIANCA y**

**KILAYANGIRI, SAREETHA**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 764 805 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Terapia de combinación que comprende una inmunocitocina inflamatoria y una célula T con receptor de antígeno quimérico (CAR)

5

### Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la inmunoterapia celular.

### Antecedentes

10

15

20

25

La inmunoterapia celular del cáncer tiene como objetivo romper la tolerancia de la enfermedad maligna a la erradicación mediada por el sistema inmunitario. Una forma de lograr esto es mediante la transferencia adoptiva de células T efectoras específicas de antígeno tumoral. Las principales limitaciones han sido la rareza de células T con especificidad y avidéz suficiente para antígenos asociados a tumor dentro de los repertorios<sup>1</sup> de células T naturales, y el fracaso de muchas células tumorales para presentar antígeno a las células T. La modificación por ingeniería genética del receptor de antígeno quimérico (CAR) permite ahora generar una gran cantidad de células T específicas de antígeno asociado a tumor. Los CAR consisten en dominios de unión a ligando derivados de anticuerpos unidos a vías de señalización de células T estimuladoras. Por tanto, combinan el reconocimiento de antígenos y la transducción de señales en moléculas individuales. La modificación por ingeniería genética de CAR puede redirigir las células T hacia los antígenos de la superficie tumoral independientemente de la presentación del antígeno por el complejo CMH y, de ese modo, supera el escape inmunitario del tumor mediante la regulación por disminución de la presentación de antígeno de CMH. De hecho, los inventores y otros han demostrado que la interacción de los CAR con el antígeno tumoral induce potentes funciones efectoras de células T y media la inmunoprotección contra el crecimiento tumoral en modelos murinos.

30

Después de 15 años de desarrollo preclínico y clínico temprano, los recientes resultados en leucemia han dado un impulso sustancial al campo. Sin embargo, las terapias con células T con CAR también han iniciado la exploración clínica en tumores sólidos no hematológicos. En un primer ensayo clínico en humanos de fase I/II, Louis *et al.* (2011) han demostrado efectos antitumorales moderados de células T específicas de GD<sub>2</sub> contra neuroblastomas resistentes que se correlacionaron con la persistencia *in vivo* de las células T.

35

Sin embargo, no se comunicaron respuestas objetivas de otros ensayos clínicos piloto y de fase I en tumores sólidos (Kershaw *et al.*, 2006; Lamers *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007). Proc. Natl. Acad. Sci. PNAS 96(15), 20 de julio de 1999, páginas 8591-8596 y Cancer Res. 74(19 supl. S), 1 de octubre de 2014, resumen LB199 dan a conocer una terapia para el cáncer que incluye inmuno-IL2 y una célula T con CAR. Cytotherapy 17(4), enero de 2015, páginas 487-495 da a conocer el descubrimiento de que diferentes citocinas influyen en la expansión de un receptor de antígeno quimérico para una célula T con CAR que reconoce GD<sub>2</sub>.

40

45

Mientras que las células leucémicas residuales mínimas circulan a menudo en la sangre periférica, la selección como diana eficaz de tumores sólidos requiere el reclutamiento de células T con CAR a sitios extravasculares dentro del tumor. Las células T con CAR son más eficaces a altas razones de célula efectora frente a diana, incluso cuando tumores relativamente pequeños con volúmenes de 1 cm<sup>3</sup> pueden contener más de 10<sup>9</sup> células cancerosas viables. Por este motivo, un gran número de células T ha de infiltrar el tumor. Una barrera crítica es el microambiente tumoral que protege a las células tumorales frente al ataque inmunitario y promueve el crecimiento, supervivencia, angiogénesis e invasión tumorales. Las características del nicho tumoral son una falta de señales de peligro inmunológico necesarias para la activación inmunitaria, y la presencia de factores inmunosupresores y células con función inmunoreguladora.

50

Para ser eficaces, las células T con CAR tendrían que infiltrar tal tumor, y sobrevivir y permanecer funcionales dentro de este ambiente, además de interrumpir de manera eficaz la inmunosupresión inducida por tumor.

55

Un objeto de la presente invención es aumentar el número de células T intratumorales con CAR y la eficacia de la terapia basada en células T con CAR en el tratamiento de estados médicos. Otro objeto de la presente invención es aumentar el número y la eficacia de células T con CAR dentro de tumores para el tratamiento de tumores sólidos. Todavía otro objeto de la presente invención es proporcionar nuevas opciones de tratamiento en el tratamiento de enfermedades neoplásicas.

60

### Realizaciones de la invención

Estos y otros objetos se cumplen con métodos y medios según las reivindicaciones independientes de la presente invención. Las reivindicaciones dependientes se refieren a realizaciones específicas.

65

### Sumario de la invención

Antes de que la invención se describa en detalle, debe entenderse que esta invención no está limitada a las partes

de los componentes particulares de los dispositivos descritos o etapas del procedimiento de los métodos descritos ya que tales dispositivos y métodos pueden variar. También es posible entender que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir únicamente realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitativa. Debe indicarse que, tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un,” “una” y “el/la” incluyen referentes singulares y/o plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Además, debe entenderse que, en el caso en el que se den los intervalos de parámetros delimitados por valores numéricos, se considera que los intervalos incluyen estos valores de limitación.

Según una realización de la invención, se proporciona una combinación, combinación que comprende al menos

a) una proteína de fusión que comprende

a1) una proteína de unión que reconoce específicamente un antígeno relacionado con cáncer y

a2) una citocina inflamatoria, y

b) una célula T con receptor de antígeno quimérico (CAR) que reconoce un antígeno relacionado con cáncer,

en la que la proteína de unión comprende al menos uno del grupo seleccionado de

- anticuerpo,
- formato de anticuerpo modificado,
- fragmento o derivado de anticuerpo que conserva las propiedades de unión a la diana
- proteína de unión basada en anticuerpos,
- aglutinante oligopeptídico y/o
- un mimético de anticuerpo.

El término “citocina inflamatoria” abarca una amplia y categoría de proteínas pequeñas (~5-30 kDa) que son importantes en la señalización celular y promueven la inflamación sistémica. Las producen predominantemente linfocitos o macrófagos activados y están implicadas en la regulación por incremento de reacciones inflamatorias.

El término “proteína de unión que reconoce específicamente un antígeno relacionado con cáncer” se refiere a proteínas o péptidos que se unen a antígenos relacionados con cáncer con alta especificidad y selectividad. En el presente contexto, la proteína de unión actúa como dispositivos de migración para la citocina, es decir, dirige la citocina a un sitio tumoral.

El término “antígeno relacionado con cáncer” se refiere a una estructura que (i) puede reconocer y unirse mediante una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, con alta especificidad, sensibilidad y afinidad, (ii) es muy abundante en tejido precanceroso o canceroso, incluyendo tumores, linfoma y leucemia, y (iii) no es abundante preferiblemente, o sólo muy poco abundante, en tejido no canceroso.

La proteína de fusión que comprende una proteína de unión y una citocina inflamatoria se denomina “inmunocitocina” a continuación en el presente documento.

Los receptores de antígeno quimérico de células T son receptores modificados por ingeniería genética que injertan una especificidad de unión en una célula T efectora inmunitaria, en combinación con dominios coestimuladores y la cadena zeta del receptor de células T para activación celular después de la unión. Normalmente, estos receptores se usan para injertar la especificidad de un anticuerpo monoclonal en una célula T, con transferencia de su secuencia codificante facilitada, por ejemplo, mediante vectores retrovirales.

La forma más común de estas moléculas son fusiones de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) derivados de anticuerpos monoclonales, fusionados a dominios coestimuladores tales como CD28 o 4-1BB y transmembrana CD3-zeta y endodominio. Tales moléculas pueden dar como resultado la transmisión eficaz de una señal zeta en respuesta a la unión por el scFv de su diana.

Los inventores han mostrado sorprendentemente que una inmunocitocina que se une a una diana específica de tumor aumenta drásticamente la infiltración de células T con CAR en el respectivo tumor. Sin pretender limitarse a la teoría, la infiltración tumoral de células T con CAR parece estar muy limitada.

Además, la combinación de inmunocitocinas desnudas con células T no transducidas también produce únicamente

infiltración tumoral limitada de estas células. El hallazgo de que ambas señales, por medio de CAR y una inmunocitocina, provocan una infiltración eficaz, es un hecho sorprendente.

5 Existen diferentes especulaciones para explicar este hallazgo. La inmunosupresión activa mediada por tumor puede tener un papel en la limitación de la eficacia de células T con CAR (Zou 2005), mientras que otros autores culpan a los cambios funcionales en los linfocitos T después de su manipulación *ex vivo* de la capacidad reducida de células T con CAR cultivadas para penetrar tumores (Caruana *et al*, 2015). También parece que los tumores están a menudos rodeados por un estroma desmoplásico que las células han de penetrar.

10 Sin embargo, ninguna de estas teorías sugiere de manera plausible que una combinación de células T con CAR con una inmunocitocina mejoraría la infiltración tumoral de las células. No hay justificación plausible que pueda explicar cómo la inmunocitocina superaría los problemas comentados anteriormente con respecto a la infiltración tumoral de células T con CAR.

15 Basándose en el conocimiento actual fue, por tanto, sorprendente encontrar que la adición de tal proteína de fusión a células T con CAR adecuadas potencia drásticamente la infiltración tumoral de las células, permitiendo por tanto un aumento de la eficacia antitumoral.

20 La técnica anterior enseña en sentido contrario a tal solución. El documento WO2015164354A1 da a conocer la terapia con células T (en particular CAR de CD 19) en combinación con un inhibidor de la ruta de IL-33. La justificación detrás de esta combinación es que se sospechó que algunas células T con CAR provocaban enfermedad relacionada con citocinas ("tormentas de citocinas"). Para evitar o mejorar esta consecuencia, los autores sugieren la coadministración de un inhibidor de la ruta de IL-33.

25 Pegram *et al.* (2015) sugieren células T con CAR de CD-19 con IL-12 transgénica (CAR de CD 19 (19z1IRESIL-12). Tales células expresan IL-12 y aumentan supuestamente la eficacia antitumoral. Los autores explican que la administración sistémica de IL-12, que se ha realizado en un experimento paralelo, provocaría efectos secundarios inflamatorios (tormenta de citocinas), por tanto su realización sería ventajosa. Sin embargo, dado que IL12 se expresa *in situ* por las células T con CAR, la dosificación de la misma no puede controlarse, lo que genera riesgos sustanciales. Además, dicha realización no puede potenciar la penetración de las células T con CAR en el tumor.

30 Según una realización, el antígeno relacionado con cáncer reconocido por la proteína de unión esta relacionado con estroma canceroso y/o la célula T con receptor de antígeno quimérico (CAR) reconoce un antígeno relacionado con células cancerosas.

35 Tal realización se basa en una interacción definida entre la proteína de unión y la célula T con CAR, con la primera uniéndose a estroma canceroso y la última uniéndose a células cancerosas. Sin limitarse a la teoría, esta combinación proporciona la ventaja de que la proteína de unión y las células T con CAR no compiten por las mismas dianas (por ejemplo, antígenos), para garantizar que cada una puede encontrar su diana adecuada.

40 Por otro lado, este enfoque se basa en la suposición de que el antígeno relacionado con estroma canceroso y el antígeno relacionado con células cancerosas se expresan en el mismo tumor. Este no es necesariamente el caso.

45 Dado que la proteína de unión (o la inmunocitocina, para ser precisos) sola no tiene actividad citotóxica, no necesariamente tiene que unirse a células cancerosas. En cambio, las células T con CAR sí tienen que unirse a células cancerosas, para ejercer su efecto de destrucción celular.

50 El término "antígeno relacionado con estroma canceroso" se refiere a una estructura que (i) puede reconocerse y unirse mediante una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, con alta especificidad, sensibilidad y afinidad, (ii) es muy abundante en el estroma canceroso, es decir, el microambiente que rodea las células tumorales. Un ejemplo de tal antígeno relacionado con estroma canceroso es un antígeno que se produce en fibroblastos asociados a cáncer (CAF), que en algunos tumores constituye el grueso del estroma canceroso y afectan el microambiente tumoral de modo que promueven el inicio, la angiogénesis, la invasión y la metástasis del cáncer.

55 El término "antígeno relacionado con células cancerosas" se refiere a una estructura que (i) puede reconocerse y unirse mediante una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, con alta especificidad, sensibilidad y afinidad, (ii) es muy abundante en la superficie celular de células precancerosas o cancerosas, incluyendo tumores, linfoma y leucemia, y (iii) no es abundante preferiblemente, o sólo poco abundante, en tejido no canceroso.

60 En una realización de la invención, el antígeno relacionado con cáncer reconocido por la proteína de unión es un marcador de angiogénesis.

65 Los marcadores de angiogénesis son proteínas que se expresan principalmente durante la angiogénesis, es decir, el proceso en el que se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. La angiogénesis es una etapa fundamental en la transición de tumores y linfomas desde un estado benigno hasta uno maligno, debido a la rápida proliferación de tejido canceroso desarrolla una alta demanda de nutrientes y oxígeno así como la exportación

de productos de desecho metabólico, que requieren vascularización completa. Por tanto, los respectivos marcadores son adecuados para seleccionar como diana estructuras específicas de cáncer que están relacionadas con la vascularización de tumores, y tejidos cancerosos en general.

5 En una realización adicional de la invención, el antígeno relacionado con cáncer reconocido por la proteína de unión es una fibronectina, o una isoforma de corte y empalme de la misma, de un subdominio de la misma.

10 La fibronectina es una glicoproteína de alto peso molecular (~440 kDa) de la matriz extracelular que se une a proteínas receptoras que atraviesan la membrana denominadas integrinas. La fibronectina se une a componentes de la matriz extracelular tales como colágeno, fibrina y proteoglicanos de heparán sulfato. La fibronectina existe como dímero de proteína, que consiste en dos monómeros prácticamente idénticos unidos por un par de enlaces disulfuro. La proteína fibronectina se produce a partir de un único gen, pero el corte y empalme alternativo de su pre-ARNm conduce a la creación de al menos 20 isoformas diferentes en seres humanos, cuyas funciones se comentan, entre otros, en White y Muro 2011.

15 En una realización particular de la invención, el antígeno relacionado con cáncer reconocido por la proteína de unión es una isoforma de corte y empalme de fibronectina. En otra realización particular, tal isoforma de corte y empalme de fibronectina es el dominio ED-B.

20 El término "dominio ED<sub>B</sub>" o "dominio ED-B", también debe entenderse como el extradominio B de fibronectina humana. A menudo se denomina EDB, EIIIB o EDII.

25 El extradominio B (ED<sub>B</sub>) de fibronectina es uno de los marcadores de angiogénesis mejor caracterizados descritos hasta ahora (Zardi *et al.*, 1987; Kaspar *et al.* 2006). Este dominio de homología tipo III de 91 aminoácidos puede insertarse en la molécula de fibronectina durante la remodelación tisular activa mediante un mecanismo de corte y empalme alternativo (Zardi *et al.*, citado anteriormente). El ED<sub>B</sub> es esencialmente indetectable en tejidos adultos sanos pero es muy abundante en la vasculatura de muchos tumores sólidos agresivos, en particular en el estroma de los mismos, haciendo por tanto de ED<sub>B</sub> una diana adecuada para la terapia contra el cáncer tal como se sugiere en el presente documento. Los anticuerpos anti-ED<sub>B</sub> se conocen en la técnica anterior, y se describen por ejemplo en el documento WO 97/45544.

30 Preferiblemente, la proteína de unión que se une al dominio ED<sub>B</sub> de fibronectina presenta una alta afinidad por el dominio ED<sub>B</sub> de FN. En particular, la proteína de unión se une al dominio de fibronectina ED<sub>B</sub> con afinidad nanomolar o subnanomolar. Tales proteínas de unión se conocen en la técnica anterior y, por ejemplo, se describen en el documento WO99/58570.

35 En una realización específica, la proteína de unión se une específicamente al dominio de fibronectina oncofetal ED<sub>B</sub>. Una proteína de unión de este tipo es huBC1, que es un anticuerpo humanizado que selecciona como diana una secuencia críptica de la isoforma de fibronectina que contiene ED-B humana, B-FN, presente en la matriz extracelular subendotelial de la mayoría de los tumores agresivos. La B-FN es oncofetal y está asociada a angiogénesis.

40 En una realización adicional de la invención, la citocina inflamatoria es una seleccionada del grupo que consiste en IL2 e IL15.

45 IL2 e IL15 pertenecen a la familia común de citocinas de cadena  $\gamma$ . La interleucina 2 (IL2) es una molécula de señalización de citocina del sistema inmunitario que regula las actividades de los glóbulos blancos que son responsables de la inmunidad. IL2 media su efecto uniéndose a receptores de IL2, que se expresan mediante linfocitos. IL2 tiene un efecto directo sobre las células T, en la medida en que facilita la diferenciación de células T para dar células T efectoras y para dar células T de memoria cuando la célula T inicial también se estimula mediante un antígeno.

50 La interleucina 15 (IL15) es una citocina con similitud estructural con IL2 (véase la figura 9). Como IL2, IL15 se une a y señala a través de un complejo que se compone de cadena beta de receptor de IL2/IL15 (CD122) y la cadena gamma común (gamma-C, CD132). Como consecuencia, las dos citocinas comparten funciones y elementos de señalización, específicamente inducción de proliferación de células T. La IL15 la secretan fagocitos mononucleares, por ejemplo, tras infección por virus. Tiene un papel clave en el mantenimiento de poblaciones de células T de memoria durante largos periodos de tiempo mediante expansión homeostática.

55 En una realización de la invención, la célula T con CAR reconoce el disialogangliósido GD2. GD2 es un antígeno disialogangliósido expresado en células tumorales de origen neuroectodérmico, incluyendo neuroblastoma humano, sarcoma de Ewing y melanoma, con expresión muy limitada en tejidos normales, principalmente en el cerebelo y nervios periféricos en seres humanos. Por tanto, es una diana adecuada para enfoques terapéuticos con anticuerpos monoclonales o células T con CAR.

60 Los "anticuerpos", también denominados de manera sinónima "inmunoglobulinas" (Ig), comprenden generalmente

cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) y son, por tanto, proteínas multiméricas, o un homólogo de Ig equivalente de las mismas (por ejemplo, un nanocuerpo de camélido, que comprende sólo una cadena pesada, anticuerpos con un solo dominio (dAb) que pueden derivarse de una cadena o bien pesada o bien ligera); incluyendo mutantes, variantes o derivados de los mismos funcionales de longitud completa (incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos murinos, quiméricos, humanizados y totalmente humanos, que conservan las características de unión a epítipo esenciales de una molécula de Ig, e incluyen inmunoglobulinas de dominio específico dual, biespecífico, multispecífico y variable dual; las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) y alotipo.

Una "proteína de unión basada en anticuerpos", tal como se usa en el presente documento, puede representar cualquier proteína que contiene al menos un dominio de inmunoglobulina  $V_H$ ,  $V_L$  o  $C_H$  derivado de anticuerpo en el contexto de otros componentes no derivados de inmunoglobulina o no derivados de anticuerpo. Tales proteínas basadas en anticuerpos incluyen, pero no se limitan a (i) proteínas de fusión  $F_c$  de proteínas de unión, incluyendo receptores o componentes de receptores con todos o parte de los dominios  $C_H$  de inmunoglobulina, (ii) proteínas de unión, en las que los dominios  $V_H$  y/o  $V_L$  se acoplan a andamios moleculares alternativos, o (iii) moléculas, en las que los dominios  $V_H$  y/o  $V_L$  y/o  $C_H$  de inmunoglobulina se combinan y/o se ensamblan de una manera que no se encuentra normalmente en fragmentos de anticuerpo o anticuerpos que se producen de manera natural.

Un "fragmento o derivado de anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que comprende al menos una cadena polipeptídica derivada de un anticuerpo que no es de longitud completa, que incluye, pero no se limita a (i) un fragmento Fab, que es un fragmento monovalente que consiste en los dominios de cadena ligera variable ( $V_L$ ), cadena pesada variable ( $V_H$ ), cadena ligera constante ( $C_L$ ) y cadena pesada constante 1 ( $C_H1$ ); (ii) un fragmento  $F(ab')_2$ , que es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un enlace disulfuro en la región de bisagra; (iii) una porción de cadena pesada de un fragmento  $F_{ab}$  ( $F_d$ ), que consiste en los dominios  $V_H$  y  $C_H1$ ; (iv) un fragmento de fragmento variable ( $F_v$ ), que consiste en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento de anticuerpo de dominio (dAb), que comprende un único dominio variable; (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR); (vii) un fragmento  $F_v$  de cadena sencilla (scFv); (viii) un diacuerpo, que es un anticuerpo bivalente, biespecífico en el que los dominios  $V_H$  y  $V_L$  se expresan en una única cadena polipeptídica, pero usando un ligador que es demasiado corto como para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de ese modo a los dominios a aparearse con los dominios de complementariedad de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno; y (ix) un anticuerpo lineal, que comprende un par de segmentos  $F_v$  en tándem ( $V_H-C_H1-V_H-C_H1$ ) que, junto con los polipéptidos de cadena ligera de complementariedad, forman un par de regiones de unión a antígeno; y (x) otras porciones de cadenas pesadas y/o ligeras de inmunoglobulina de longitud no completa, o mutantes, variantes o derivados de los mismos, solas o en cualquier combinación. En cualquier caso, dicho derivado o fragmento conserva las propiedades de unión a la diana.

El término "formato de anticuerpo modificado", tal como se usa en el presente documento, abarca conjugados anticuerpo-fármaco, scFv modificado con óxido de polialquileño, monocuerpos, diacuerpos, anticuerpos de camélidos, anticuerpos de dominio, anticuerpos bi o trispecíficos, IgA, o dos estructuras de IgG unidas mediante una cadena J y un componente secretor, anticuerpos de tiburón, región de entramado de primate del nuevo mundo + CDR de primate no del nuevo mundo, anticuerpos IgG4 con la región de bisagra retirada, IgG con dos sitios de unión adicionales modificada por ingeniería genética en los dominios  $CH3$ , anticuerpos con región de  $F_c$  alterada para potenciar la afinidad por receptores gamma de  $F_c$ , constructos dimerizados que comprenden  $CH3+VL+VH$ , y similares.

El término "mimético de anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a proteínas que no pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas, e incluso no proteínas tales como aptámeros, o polímeros sintéticos. Algunos tipos tienen una estructura de lámina beta similar a anticuerpo. Las posibles ventajas de "miméticos de anticuerpo" o "andamios alternativos" con respecto a anticuerpos son mejor solubilidad, mayor penetración en el tejido, mayor estabilidad frente al calor y las enzimas, y costes de producción comparativamente bajos.

Algunos miméticos de anticuerpos pueden proporcionarse en grandes bibliotecas, que ofrecen candidatos de unión específicos contra cada diana posible. Al igual que con los anticuerpos, los miméticos de anticuerpos específicos diana pueden desarrollarse mediante el uso de tecnologías de cribado de alto rendimiento (HTS) así como con tecnologías de visualización establecidas, justo como la visualización de fagos, visualización bacteriana, visualización de levaduras o mamíferos. Los miméticos de anticuerpos desarrollados actualmente abarcan, por ejemplo, proteínas de repetición de anquirina (denominadas DARPIn), lectinas tipo C, proteínas del dominio A de *S. aureus*, transferrinas, lipocalinas, décimos dominios de fibronectina de tipo III, inhibidores de proteasa de dominio Kunitz, aglutinantes derivados de ubiquitina (denominados Affilin), aglutinantes derivados de cristalino gamma, knotinas o nudos de cisteína, aglutinantes basados en andamios de tiorredoxina A, dominios SH-3, estradocuerpos, "dominios A" de receptores de membrana estabilizados mediante enlaces disulfuro y  $Ca^{2+}$ , compuestos basados en CTLA4, Fyn SH3 y aptámeros (moléculas peptídicas que se unen a moléculas diana específicas).

En una realización particular de la invención, la proteína de unión contiene al menos una secuencia de CDR del anticuerpo L19. La capacidad de selección como diana del tumor del anticuerpo humano de alta afinidad L19 (Pini *et al.*, 1998), específico para ED<sub>B</sub>, se ha establecido bien tanto en modelos animales de cáncer (Borsi *et al.*, 2002; Berndorff *et al.*, 2006; Berndorff *et al.*, 2005; Demartis *et al.*, 2001) y en pacientes con tumores sólidos (Santimaria *et al.*, 2003). Recientemente, también se encontró la expresión de ED<sub>B</sub> en la mayoría de las muestras de tejido infiltradas en linfoma de diversos pacientes con linfoma no Hodgkin (Sauer *et al.*, 2006), así como en linfoma de Hodgkin (Schliemann *et al.*, 2009).

La proteína de unión que reconoce específicamente fibronectina de ED<sub>B</sub>, en particular el anticuerpo L19, puede emplearse en diversos formatos de anticuerpo. Los formatos de anticuerpo preferidos son IgG completa, Fab, (Fab')<sub>2</sub>, scFv, diacuerpo o formato de minicuerpo. Especialmente preferidos son la IgG completa, scFv y formato SIP para el anticuerpo L19. Lo más preferido es el anticuerpo L19 en el formato scFv. En la técnica anterior se conocen varios formatos de inmunoproteína, por ejemplo, basados en el dominio CH3 o el dominio  $\epsilon_{S2}$ -CH4 de IgE. El formato SIP preferido para L19 basándose en el dominio  $\epsilon_{S2}$ -CH4 de IgE y L19 en el formato de IgG completa se describe, por ejemplo, en el documento WO03/076469.

En una realización de la invención, la proteína de unión comprende las secuencias según SEQ ID NO: 6 a 11. Preferiblemente, la proteína de unión comprende al menos una cadena pesada V según SEQ ID NO: 1 o al menos una cadena ligera V según SEQ ID NO: 2.

En una realización adicional de la invención, la cadena pesada y la ligera se conectan mediante un ligador peptídico.

En una realización preferida de la invención, el ligador peptídico comprende una secuencia según SEQ ID NO: 3, o una secuencia que tiene al menos una identidad del 90% con respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 3.

En otra realización de la invención, la IL2 o la IL15 es IL2 o IL15 de mamífero, preferiblemente IL2 o IL15 humana, o una variante funcional de la misma.

Las variantes funcionales de IL2 o IL15 son variantes de IL2 o IL15 humana que presentan al menos el 10%, pero más preferiblemente más del 50%, e incluso más preferido más del 90% de la actividad de IL2 o IL15 humana nativa. Las actividades de interleucina son actividades de interleucina en ensayos bioquímicos o *in vivo*.

La actividad de IL2 puede medirse mediante el efecto sobre la proliferación y/o diferenciación de linfocitos T y B activados y de linfocitos citotóxicos naturales y/o inducción de actividad de células T citotóxicas y/o actividad antitumoral citotóxica activada por NK/linfocina (LAK) (Meazza *et al.*, 1996).

En particular, las variantes funcionales son muteínas de cisteína-125 de interleucina 2 tal como se describe en el documento EP0109748 y otras muteínas, incluyendo muteínas de cisteína tal como se describe en el documento EP0136489, en particular serina 125-interleucina 2. Además, el extremo N-terminal de variantes hIL2 puede alterarse sin afectar significativamente la actividad, en particular los aminoácidos 1-5 N-terminales, especialmente preferido la alanina N-terminal puede delecionarse o alterarse, preferiblemente delecionarse. Además, la interleucina 2 puede contener modificaciones postraduccionales alteradas o delecionadas, en particular el patrón de glicosilación puede estar alterado o faltar. Puede obtenerse una glicosilación diferente o ausente, por ejemplo, o bien mutando la secuencia o bien mediante expresión de la proteína de fusión en un huésped apropiado. Por ejemplo, la aldesleucina, que está aprobada para CCR metastásico, es des-alanil-1, serina-125 interleucina-2 humana no glicosilada producida en *E. coli*.

La actividad de interleucina 15 puede determinarse con los métodos dados a conocer por Paxton 2001. Las variantes funcionales de IL15 son, entre otras, ALT-803, producida por Alter Bioscience; que es un mutante IL15N72D combinado y el dominio soluble de IL15R $\alpha$ . A partir de 2014, se han presentado IND para ensayos clínicos para 4 indicaciones: melanoma metastásico, recidiva de tumores malignos hematológicos después del trasplante de células madre alógenas, mieloma múltiple resistente y cáncer de vejiga no músculo invasivo que no se ha tratado con BCG en combinación con BCG.

Tanto la interleucina 2 como la interleucina 15 pueden producirse de manera recombinante o pueden aislarse a partir de tejido de mamífero o humano.

En una realización particular de la invención, la IL2 comprende una secuencia según SEQ ID NO: 4, o una variante funcional de la misma.

Dicha secuencia de interleucina 2 humana después de la escisión del propéptido tiene 133 residuos de AA, mientras que el precursor que comprende el propéptido tiene 153 residuos de AA.

En otra realización particular de la invención la IL15 comprende una secuencia según SEQ ID NO: 12, o una variante funcional de la misma.

Dicha secuencia de interleucina 15 humana después de la escisión del propéptido tiene 114 residuos de AA, mientras que el precursor que comprende el propéptido tiene 133 residuos de AA.

5 La proteína de unión y la citocina pueden fusionarse directamente entre sí, o por medio de uno o más ligadores químicos o ligadores peptídicos. Tales proteínas de fusión se conocen en la técnica anterior y se describen, por ejemplo, en el documento WO01/062298.

10 En una realización de la invención un ligador de proteína de fusión conecta la proteína de unión y la parte de citocina inflamatoria. Preferiblemente, el ligador de proteína de fusión tiene una longitud de entre  $\geq 1$  y  $\leq 30$  aminoácidos.

En una realización preferida, el ligador de proteína de fusión comprende una secuencia según SEQ ID NO: 5.

15 La proteína de fusión puede ser monomérica o multimérica, por ejemplo, dimérica. Las formas diméricas u otras multiméricas pueden formarse de manera covalente o no covalente. Las proteínas de fusión se producen preferiblemente de manera recombinante usando métodos conocidos para el experto. En particular, pueden usarse sistemas de expresión procariotas o eucariotas, por ejemplo, sistemas de expresión en levaduras o mamíferos.

20 Preferiblemente, la proteína de fusión es el conjugado darleucina L19-IL2, fabricado por Philogen S.p.A. La darleucina se da a conocer, entre otros, en List y Neri (2013).

En otra realización, la proteína de fusión es un conjugado L19-IL15, fabricado por Philogen S.p.A., y dado a conocer, entre otros, en Kaspar *et al* 2007.

25 En una realización particular de la invención, el receptor de antígeno quimérico (CAR) en la célula T comprende 14.G2a-zeta, 14.G2a-BBzeta o 14.G2a-28zeta.

30 14.G2a-zeta es una fusión de un scFv derivado de hibridoma 14g2a, que reconoce el disialogangliósido GD2. 14.G2a es un anticuerpo específico de GD2 del cual se derivó el CAR. La línea celular de hibridoma 14.G2a (IgG2a; $\kappa$  de ratón) 15 la generó el Dr. R.A. Reisfeld (La Jolla, CA) (Mujoo *et al.*, 1989).

14.G2a-BBzeta es un CAR de 2ª generación que además comprende 4-1BB (CD137), que actúa como dominio de señalización coestimulador del CAR, y sirve para potenciar la activación antigénica y aumentar la potencia (Imai *et al.*, 2004). Se usan 14.G2a-BBzeta y GD2.BBz de manera intercambiable en el presente documento.

35 El CAR de 2ª generación alternativo, 14.G2a-28zeta, denominado alternativamente GD2.28z, (Liebsch *et al.* Br J Cancer 2014. PMID: 23839490) contiene el dominio coestimulador de CD28, también para aumentar la activación de células T mediada por CAR.

40 Según otro aspecto de la invención, se proporciona la combinación según la descripción anterior para su uso en el tratamiento de un sujeto humano o animal

- que padece,
- corre el riesgo de desarrollar, y/o
- 45 • se le ha diagnosticado

50 un estado patológico dado. Preferiblemente, dicho estado patológico es una enfermedad neoplásica. El término enfermedad neoplásica se refiere a cualquier crecimiento anómalo de tejidos o células, en particular de crecimiento maligno. Abarca cánceres primarios, cánceres secundarios y metástasis, incluyendo carcinoma, sarcoma, melanoma, linfoma y leucemia.

55 En una realización preferida, el estado patológico es un tumor sólido, en particular un linfoma, carcinoma o un sarcoma. En otra realización preferida el estado patológico es leucemia.

Según otro aspecto de la invención, la proteína de fusión y la célula T con receptor de antígeno quimérico (CAR) van a administrarse como terapia concomitante y/o complementaria.

60 La terapia complementaria es terapia que se administra además de la terapia primaria, principal o inicial para maximizar su eficacia. La terapia concomitante se refiere a administrar un tratamiento médico dado al mismo tiempo que otro tratamiento.

65 Según otro aspecto de la invención, la proteína de fusión y la célula T con receptor de antígeno quimérico (CAR) van a administrarse como terapia secuencial. Por ejemplo, en una realización el paciente humano o animal se trata en primer lugar con la proteína de fusión, y luego con las células T con CAR. En otras realizaciones, puede usarse un

esquema de administración alterna.

**Experimentos y figuras**

5 Si bien la invención se ha ilustrado y descrito en detalle, en los dibujos y la descripción anterior, tal ilustración y descripción han de considerarse ilustrativas o ejemplares y no limitativas; la invención no se limita a las realizaciones dadas a conocer. Los expertos en la técnica pueden entender y efectuar otras variaciones de las realizaciones dadas a conocer en la práctica de la invención reivindicada, a partir de un estudio de los dibujos, la divulgación y las reivindicaciones adjuntas. En las reivindicaciones, el término “que comprende” no excluye otros elementos o etapas, y el artículo indefinido “un” o “una” no excluye una pluralidad. El mero hecho de que determinadas medidas se mencionen en reivindicaciones dependientes mutuamente diferentes no indica que una combinación de estas medidas no pueda usarse con ventaja. Ningún signo de referencia en las reivindicaciones debe interpretarse como que limita el alcance.

15 **Figuras**

Figura 1: diseño experimental para evaluar la actividad antitumoral del direccionamiento conjunto de L19-IL2 y células T con CAR contra xenoinjertos de sarcoma de Ewing localizados. Se usaron los siguientes grupos de terapia:

| serie | anticuerpo | células T                 |
|-------|------------|---------------------------|
| 1     | KSF-IL2    |                           |
| 2     | L19-IL2    |                           |
| 3     |            | células T no transducidas |
| 4     |            | CAR-T (14.G2a-BBzeta)     |
| 5     | L19-IL2    | células T no transducidas |
| 6     | L19-IL2    | CAR-T (14.G2a-BBzeta)     |

20 Las figuras 2 - 5 muestran los resultados de experimentos de infiltración de células T mediante tinción de CD3.

Figura 2A: KSF-IL2; figura 2B: L19-IL2. No puede detectarse infiltración de células T con CAR.

25 Figura 3A: células T no transducidas, irrelevantes sin L19-IL2. Puede detectarse aproximadamente el 1% de infiltración de células T intratumorales. La estimación cuantitativa de porcentajes se basa en una estimación aproximada según la rutina de un patólogo experimentado.

30 Figura 3B: células T con CAR (14.G2a-BBzeta, pero sin L19-IL2): la infiltración de células T intratumorales es de aproximadamente el 5%, pero no pueden encontrarse células T intravasculares ni peritumorales.

Figura 4: células T no transducidas más L19-IL2. La infiltración de células T intratumorales es de aproximadamente el 3% pero la mayoría de las células T se encontró que eran peritumorales.

35 Figura 5: células T con CAR (14.G2a-BBzeta) + L19-IL2. La infiltración de células T intratumorales es de aproximadamente el 10%, la infiltración de células T intravasculares es de aproximadamente el 30%, la infiltración de células T peritumorales es de aproximadamente el 60%.

40 Figura 6: dibujo esquemático de la inmunocitocina darleucina (L19-IL2). Obsérvese que una versión preferida del conjugado L19-IL15 comentado en el presente documento tiene una forma similar.

45 Figura 7A: diferentes componentes de un receptor de antígeno quimérico de 1ª generación a modo de ejemplo. En este ejemplo, el TCR artificial comprende una fusión de un componente de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal dado, fusionado a la transmembrana CD3-zeta y endodominio. Tales moléculas transmiten una señal zeta en respuesta a la unión a diana del componente de anticuerpo. Cuando las células T expresan esta molécula (habitualmente lograda mediante transducción de vector oncorretroviral), reconocen y destruyen células diana que expresan la diana detectada por el componente de anticuerpo.

50 Figura 7B: estructura esquemática del receptor de antígeno quimérico 14.G2a-BBzeta (2ª generación). El constructo comprende un fragmento scFv del anticuerpo 14G2a (1A7), fusionado al dominio 4-1BB y al dominio CD3-zeta (CD3ζ) por medio de espaciadores o ligadores adecuados. El dominio CD3ζ transmite una señal proliferativa en el momento de la unión del fragmento scFv a su diana, GD2. El mimético de dominio 4-1BB de señalización coestimulador amplifica la activación de las células T con CAR, lo que conduce a una señal más robusta a la célula T para multiplicarse y destruir la célula cancerosa.

Figura 8: complejo receptor de células T. CD3-zeta es una cadena del correceptor de células T CD3, que comprende una cadena CD3 $\gamma$ , una cadena CD3 $\delta$  y dos cadenas CD3 $\epsilon$ . Estas cadenas se asocian con las cadenas TCR- $\alpha$  y TCR- $\beta$  y la cadena CD3 $\zeta$  (cadena zeta) para generar una señal de activación en linfocitos T. El TCR, la cadena CD3 $\zeta$  y las moléculas CD3 constituyen junto el complejo TCR.

Figura 9: alineación de secuencia entre IL2 e IL15. Obsérvese la similitud estructural entre las dos citocinas.

## Materiales y métodos

### 1. Experimentos de xenoinjerto de sarcoma

Se produjo un modelo de sarcoma de Ewing localizado que se basa en xenoinjerto subcutáneo de  $2 \times 10^6$  células de sarcoma de Ewing VH-64 por ratón en ratones NOD/scid gamma (NSG).

Sobre un volumen tumoral de 200-300 mm<sup>3</sup>, los ratones recibieron tratamiento intraperitoneal con L19-IL2 (30  $\mu$ g dos veces a la semana en los días 1, 5, 8, 12, 14 y 20), y con inyección intravenosa de 3 dosis de  $1 \times 10^7$  células T transducidas con 14.G2a-BBzeta, o células T no transducidas como controles (véase la figura 1). Se monitorizó el crecimiento tumoral mediante cuantificación con compás calibrador de diámetros. Se usaron 2 ratones en cada cohorte. Se usaron secciones tumorales tras la terapia para análisis histopatológicos comparativos con respecto a la infiltración de células T con (CAR) y la ubicación de inmunocitocinas. Además, la ubicación de L19-IL2 dentro del tejido tumoral se evaluó usando un anticuerpo anti-IL2 humana en procedimientos de inmunofluorescencia convencionales. L19-IL2 y 14.G2a-BBzeta se describen en detalle en cualquier parte en el presente documento. Los experimentos de control se realizaron con

(1) L19-IL2 o 14.G2a-BBzeta, respectivamente, solos

(2) KSF-IL2, que es un inmunoconjugado que se une a lisozima de huevo de gallina (KSF), y sirve como control negativo

(3) células T no transducidas sirven así mismo como controles negativos.

Los resultados de este experimento se muestran en las figuras 2 - 5.

La combinación de células T con CAR y la inmunocitocina aumentó drásticamente la infiltración tumoral, un hallazgo que no se anticipó en absoluto, debido a que ninguna de las teorías actuales que explican los desafíos a los que las células T con CAR se encuentran cuando se infiltra un tumor sólido (inmunosupresión activa mediada por tumor, cambios funcionales en linfocitos T después de la manipulación *ex vivo*, inhibición física de infiltración mediante el estroma desmoplásico que las células han de penetrar) haría obvio el efecto sinérgico que la inmunocitocina tiene sobre la infiltración de células T con CAR.

La implicación funcional de una citocina, concretamente para regular meramente la actividad de células T, no puede explicar su efecto de apoyo en el presente escenario, en el que la inmunosupresión mediada por tumores, los cambios funcionales en linfocitos T después de la manipulación *ex vivo* y/o la inhibición física de infiltración mediante el estroma desmoplásico desafían la eficacia antitumoral de las células T.

## Bibliografía

Kowalczyk A *et al.* (2009), Cancer letters vol. 281 (2) p. 171-82

List T, Neri D (2013), Clinical pharmacology: advances and applications vol. 5 págs. 29-45

Imai C *et al.* (2004), Leukemia, abril;18(4):676-84

Zou W (2005) Nat. Rev. Cancer 5, 263-274

Caruana I *et al.* (2015), Nature medicine vol. 21 (5) págs. 524-9

Louis C U *et al.* (2011), Blood, 118: 6050-6

Kershaw M H *et al.* (2005), Clin Cancer Res, 12: 6106-6115

Lamers C H J *et al.* (2007), Cancer Immunol Immunother, 56: 1875-1883

Park J R *et al.* (2007), Molecular Therapy 15: 825-833

Schliemann C *et al.* (2009), Leuk Res. diciembre;33(12):1718-22

Zardi *et al.* (1987), Embo J.;6:2337-2342

5 Kaspar *et al.* (2006), Int J Cancer, 118:1331-1339

Pini *et al.* (1998), J Biol Chem.;273:21769-21776

Borsi *et al.* (2002), Int J Cancer.;102:75-85

10 Berndorff *et al.* (2006), J Nucl Med.;47:1707-1716

Berndorff *et al.* (2005), Clin Cancer Res.;11:7053s-7063s

15 Demartis *et al.* (2001), Eur J Nucl Med;28:534-53

Meazza *et al.* (1996), Br.J.Cancer. 74:788-795

White ES, Muro AF (2011), IUBMB life vol. 63 (7) págs. 538-46

20 Rybak *et al.* (2007), Cancer research vol. 67 (22) págs. 10948-57

Paxton, R J (2001), Current protocols in immunology / editado por John E. Coligan ... [*et al.*] vol. Capítulo 6 p. Unidad 6.22

25 Kaspar *et al.* (2006), Cancer research vol. 67 (10) págs. 4940-8

Pegram *et al.* (2015), Leukemia vol. 29 (2) págs. 415-22

30 Mujoo, K; Kipps, T J; Yang, H M; Cheresch, D A; Wargalla, U *et al.* (1989), Cancer research, vol. 49 (11) págs. 2857-61

**Lista de secuencias**

| SEQ NO | Especificación                | Secuencia (código de una letra)                                                                                                                                                                                                                      |
|--------|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | L19 de Vh                     | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPPFYFDYWGQGLTVTVSS                                                                                                                                    |
| 2      | L19 de Vi                     | EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK                                                                                                                                        |
| 3      | Ligador de scFv               | GDGSSGGSGGAS                                                                                                                                                                                                                                         |
| 4      | IL2 humana                    | APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P L E E V L N L A Q S K N F H L R P R D L I S N I N I V I V L E L K G S E T T F M C E Y A D E T A T I V E F L N R W I T F C Q S I I S T L T |
| 5      | Ligador de proteína de fusión | EFSSSSGSSSSGSSSSG                                                                                                                                                                                                                                    |
| 6      | Vh de CDR1                    | SFSMS                                                                                                                                                                                                                                                |
| 7      | Vh de CDR3                    | PPFYFDY                                                                                                                                                                                                                                              |
| 8      | Vh de CDR2                    | SISGSSGTTYADSVKG                                                                                                                                                                                                                                     |
| 9      | Vi de CDR1                    | RASQSVSSSFLA                                                                                                                                                                                                                                         |
| 10     | Vi de CDR2                    | YASSRAT                                                                                                                                                                                                                                              |
| 11     | Vi de CDR3                    | QQTGRIPPT                                                                                                                                                                                                                                            |
| 12     | IL15 humana                   | NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDAS I H D T V E N L I I L A N N S L S S N G N V T E S G C K E C E E L E E K N I K E F L Q S F V H I V Q M F I N T S                                                                           |

35 **Lista de secuencias**

<110> Philogen SPA

ES 2 764 805 T3

<120> Terapia de combinación que comprende una inmunocitocina inflamatoria y una célula T con receptor de antígeno quimérico (CAR)

5 <130> PD43035

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

10

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> L19 de Vh

<400> 1

20

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 2

<211> 108

25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> L19 de VI

30

<400> 2

ES 2 764 805 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45

Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro  
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

5 <210> 3  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Ligador  
 <400> 3

Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser  
 1 5 10

15 <210> 4  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 4

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys  
 20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys  
 35 40 45

ES 2 764 805 T3

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys  
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu  
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu  
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala  
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile  
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr  
 130

5 <210> 5  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> ligador de proteína de fusión  
 <400> 5

Glu Phe Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser  
 1 5 10 15

15 Gly  
 <210> 6  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Vh de CDR1  
 <400> 6

25 Ser Phe Ser Met Ser  
 1 5

<210> 7  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Vh de CDR3

35 <400> 7

Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5

40 <210> 8  
 <211> 17  
 <212> PRT

ES 2 764 805 T3

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Vh de CDR2

5 <400> 8

Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

10 <210> 9  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> VI de CDR1

<400> 9

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala  
20 1 5 10

<210> 10  
<211> 7  
<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> VI de CDR2

30 <400> 10

Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

35 <210> 11  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> VI de CDR3

<400> 11

Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr  
45 1 5

<210> 12  
<211> 114  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 12

ES 2 764 805 T3

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile  
1 5 10 15

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His  
20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln  
35 40 45

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu  
50 55 60

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val  
65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile  
85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn  
100 105 110

Thr Ser

**REIVINDICACIONES**

1. Combinación que comprende al menos
  - 5 a) una proteína de fusión que comprende
    - a1) una proteína de unión que reconoce específicamente un antígeno relacionado con cáncer y
    - 10 a2) una citocina inflamatoria, y
  - b) una célula T con receptor de antígeno quimérico (CAR) que reconoce un antígeno relacionado con cáncer,

15 en la que la proteína de unión comprende al menos uno del grupo seleccionado de

  - anticuerpo,
  - formato de anticuerpo modificado,
  - 20 • fragmento o derivado de anticuerpo que conserva las propiedades de unión a la diana
  - proteína de unión basada en anticuerpos,
  - aglutinante oligopeptídico y/o
  - 25 • un mimético de anticuerpo.
2. Combinación según la reivindicación 1, en la que
  - 30 • el antígeno relacionado con cáncer reconocido por la proteína de unión está relacionado con estroma canceroso y/o
  - la célula T con receptor de antígeno quimérico (CAR) reconoce un antígeno relacionado con células cancerosas.
3. Combinación según la reivindicación 1, en la que el antígeno relacionado con cáncer reconocido por la proteína de unión es un marcador de angiogénesis.
4. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente, en la que el antígeno relacionado con cáncer reconocido por la proteína de unión es una fibronectina, o una isoforma de corte y empalme de la misma, y/o un subdominio de la misma.
5. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente, en la que el antígeno relacionado con cáncer reconocido por la proteína de unión es el dominio ED<sub>B</sub> de fibronectina.
6. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente, en la que la citocina inflamatoria es una seleccionada del grupo que consiste en IL2 e IL15.
7. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente, en la que la célula T con CAR reconoce el disialogangliósido GD2.
8. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente, en la que la proteína de unión contiene al menos una secuencia de CDR del anticuerpo L19.
9. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente, en la que la proteína de unión comprende las secuencias según SEQ ID NO: 6 a 11.
10. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente, en la que la proteína de unión comprende al menos una cadena pesada V según SEQ ID NO: 1 o al menos una cadena ligera V según SEQ ID NO: 2.
11. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente, en la que la cadena pesada y la ligera se conectan mediante un ligador peptídico, en la que preferiblemente el ligador peptídico comprende una secuencia según SEQ ID NO: 3, o una secuencia que tiene al menos una identidad del 90% con respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 3.

12. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente, en la que la IL2 o la IL15 es IL2 o IL15 de mamífero, preferiblemente IL2 o IL15 humana, o una variante funcional de la misma.
- 5 13. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente, en la que la IL2 comprende una secuencia según SEQ ID NO: 4, o una variante funcional de la misma.
14. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 12, en la que la IL15 comprende una secuencia según SEQ ID NO: 12, o una variante funcional de la misma.
- 10 15. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente, en la que un ligador de proteína de fusión conecta la proteína de unión y la parte de citocina inflamatoria.
16. Combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 14 - 15, en la que el ligador de proteína de fusión
- 15
- tiene una longitud de entre  $\geq 1$  y  $\leq 30$  aminoácidos y/o
  - comprende una secuencia según SEQ ID NO: 5.
- 20 17. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente, en la que la proteína de fusión está pegilada.
18. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente, en la que el receptor de antígeno quimérico (CAR) en la célula T comprende 14.G2a-zeta, 14.G2a-BBzeta o 14.G2a-28zeta.
- 25 19. Combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 18, para su uso en el tratamiento de un sujeto humano o animal
- 30
- que padece,
  - corre el riesgo de desarrollar, y/o
  - se le ha diagnosticado
- 35 un estado patológico dado.
20. Combinación según la reivindicación 19, para su uso en la terapia de un estado patológico, en el que el estado patológico es una enfermedad neoplásica, preferiblemente un tumor sólido, en particular un linfoma, carcinoma, sarcoma o una leucemia.
- 40 21. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente, para su uso en la terapia de los estados patológicos mencionados anteriormente, en la que la proteína de fusión y la célula T con receptor de antígeno quimérico (CAR) van a administrarse como terapia concomitante y/o complementaria.
- 45 22. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente, para su uso en la terapia de los estados patológicos mencionados anteriormente, en la que la proteína de fusión y la célula T con receptor de antígeno quimérico (CAR) van a administrarse como terapia secuencial.

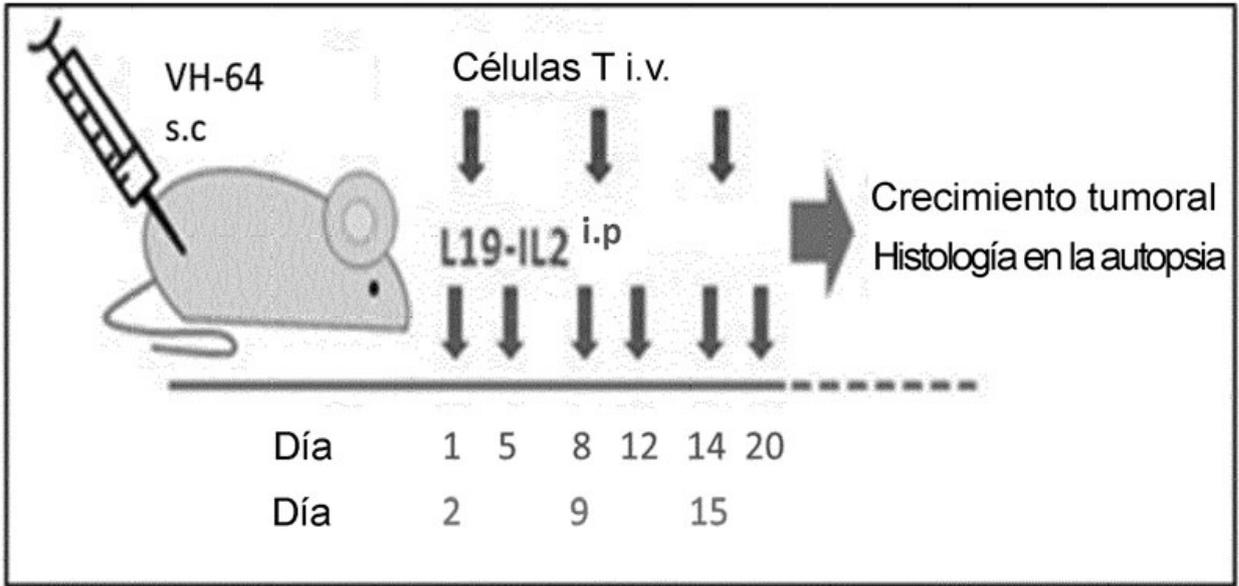


Fig. 1

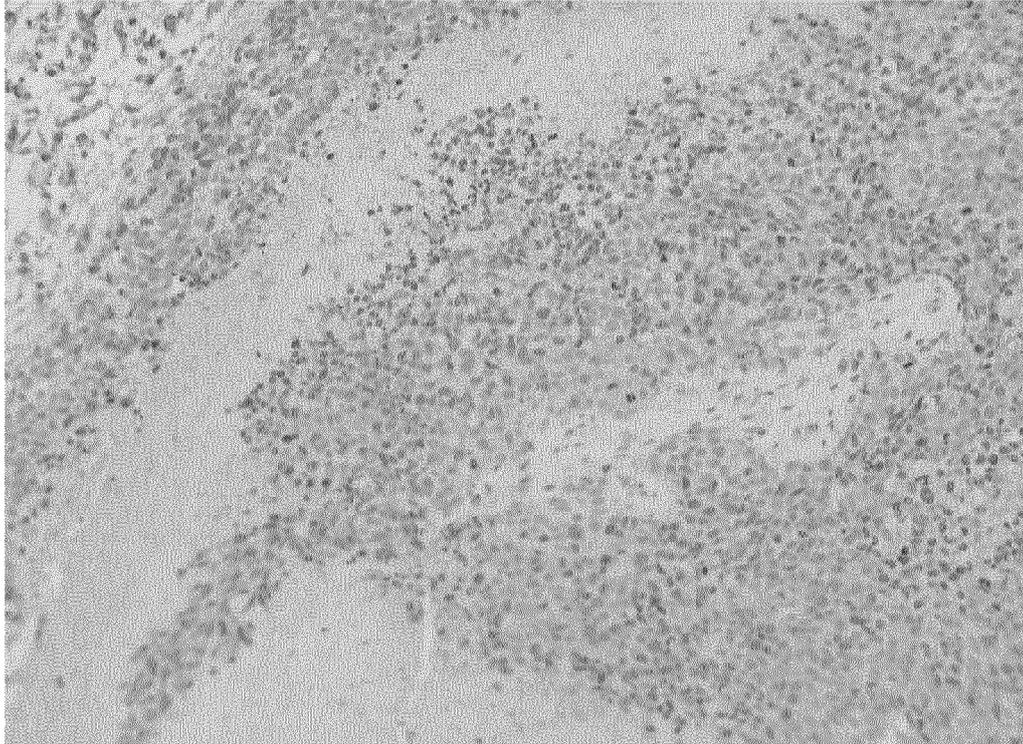


Fig. 2A

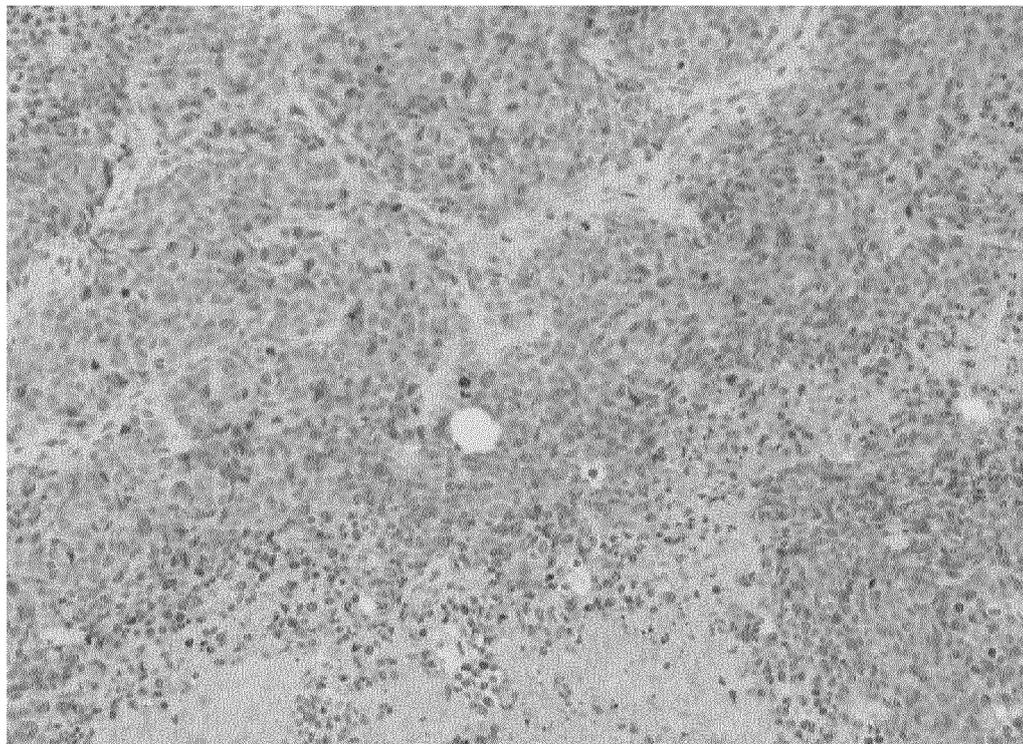


Fig. 2B

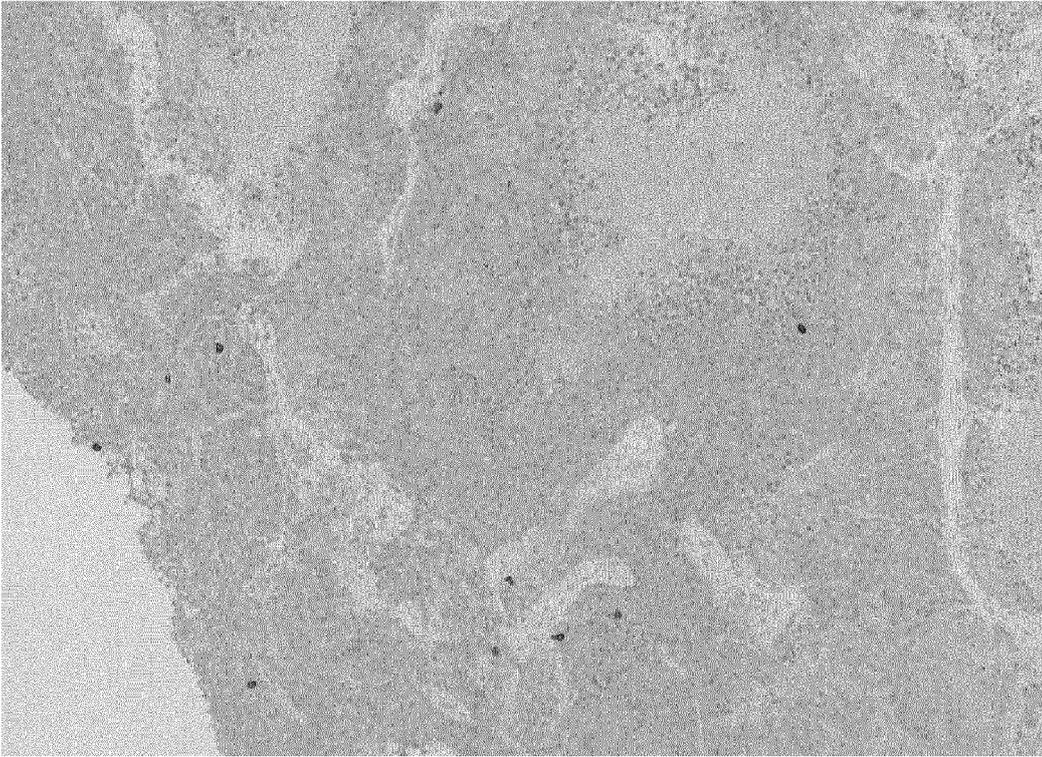


Fig. 3A

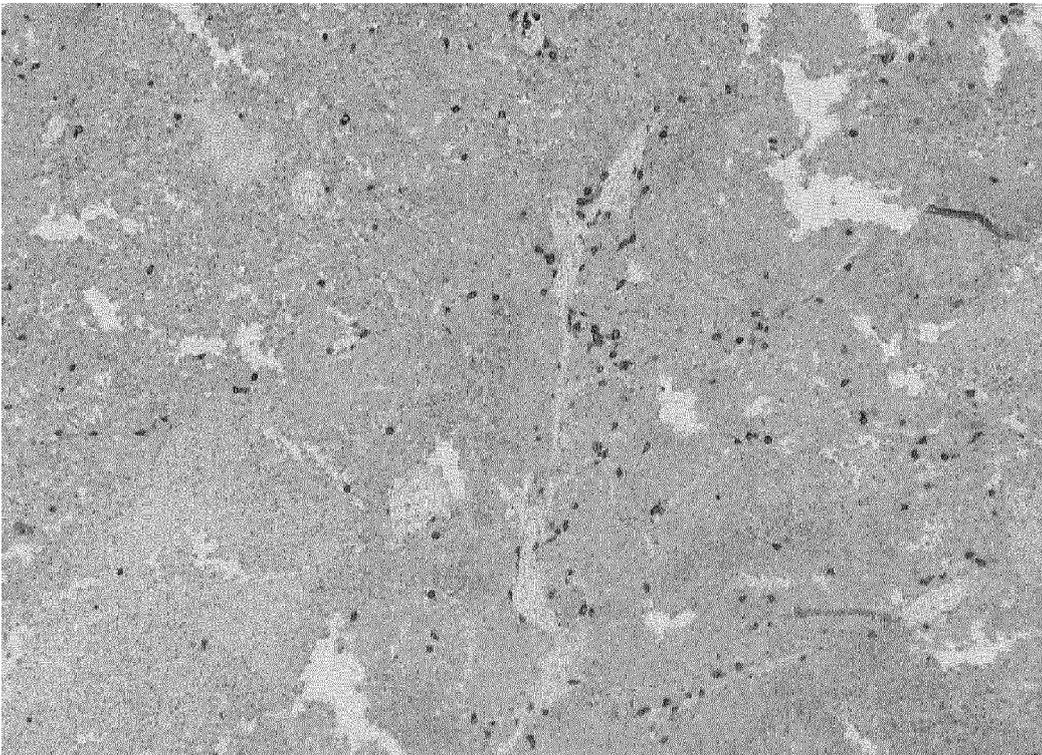


Fig. 3B

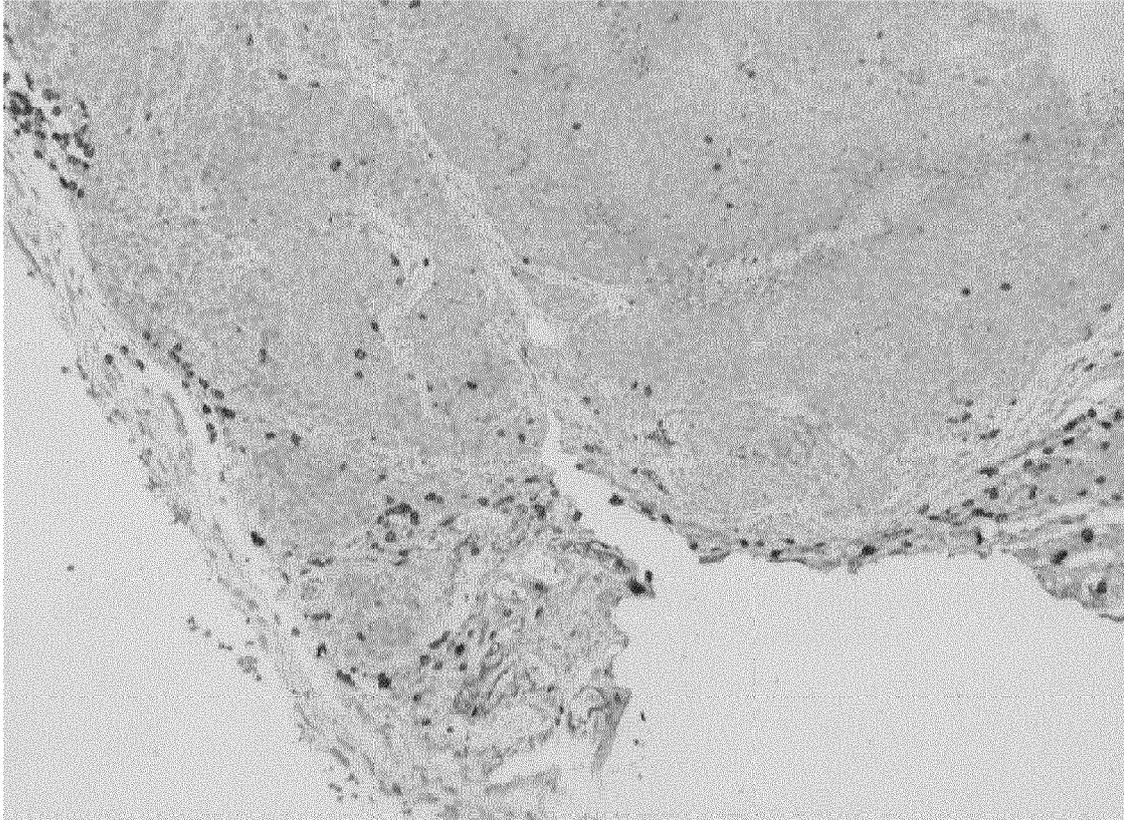


Fig. 4

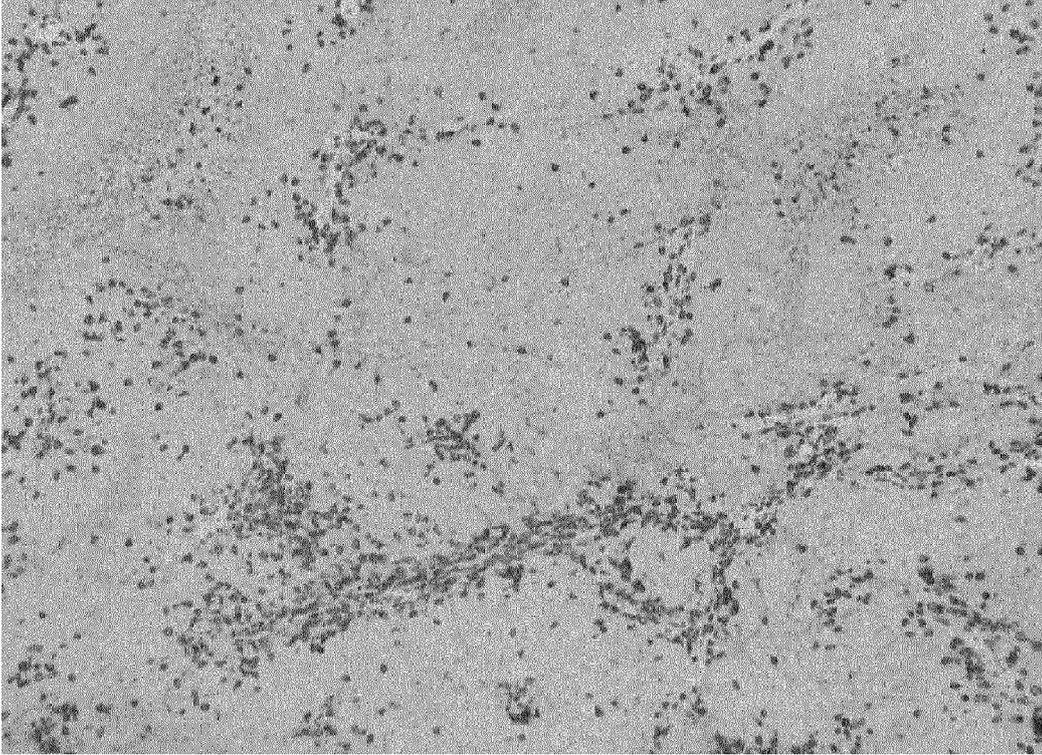


Fig. 5A

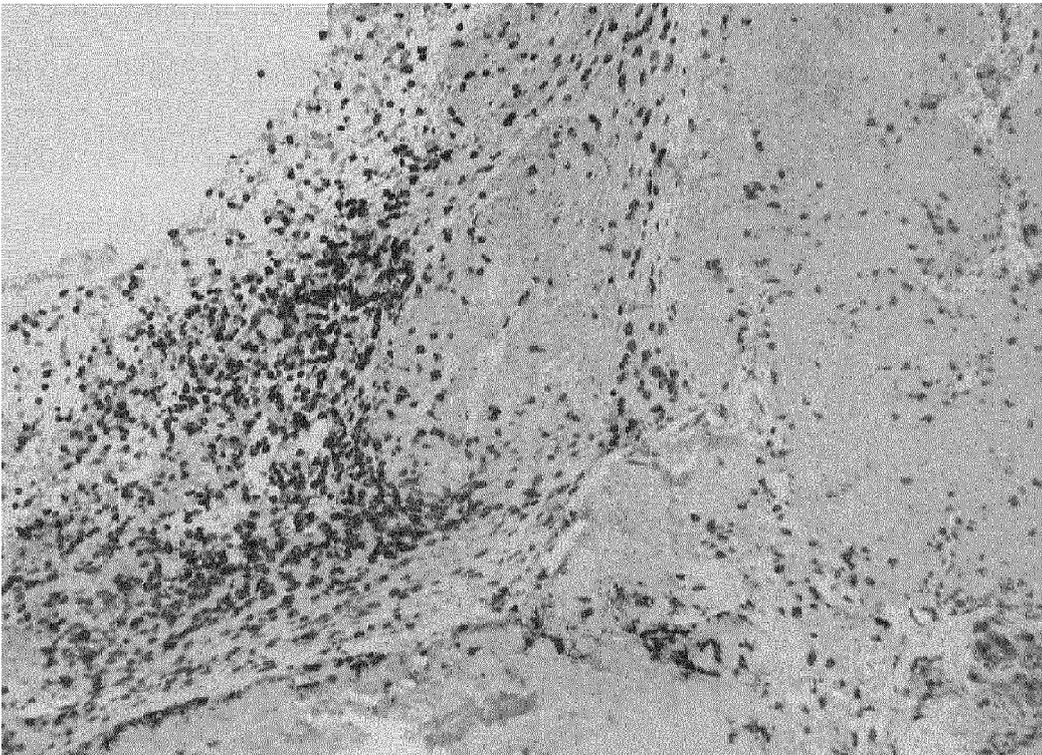


Fig. 5B

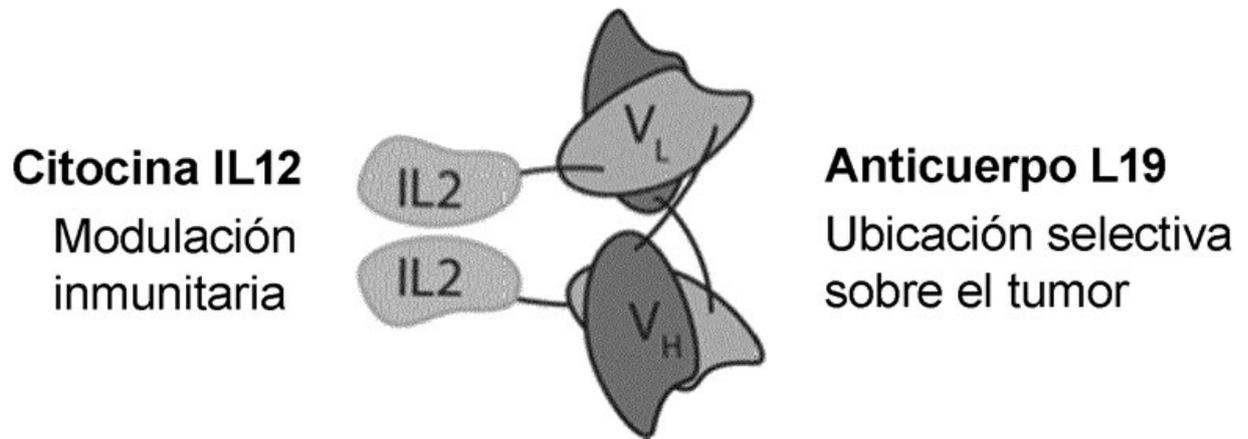


Fig. 6

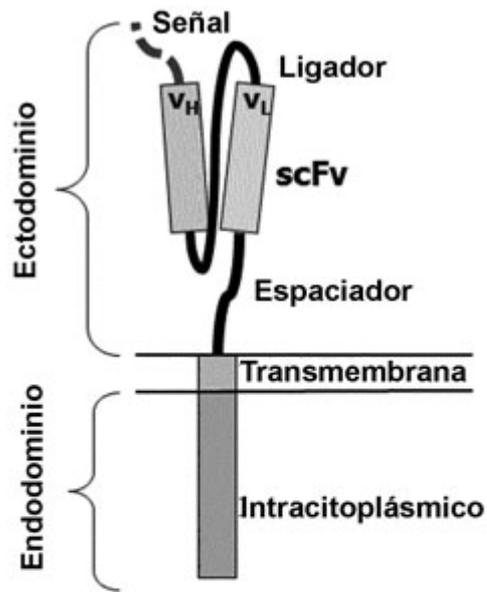


Fig. 7A

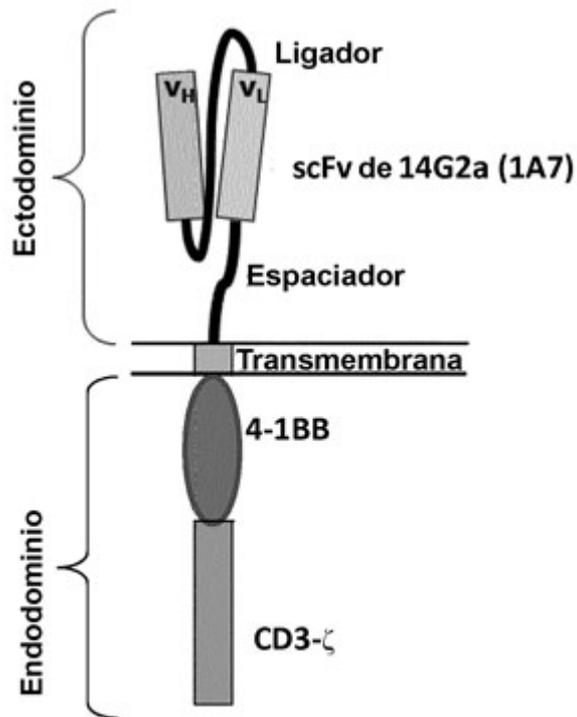


Fig. 7B

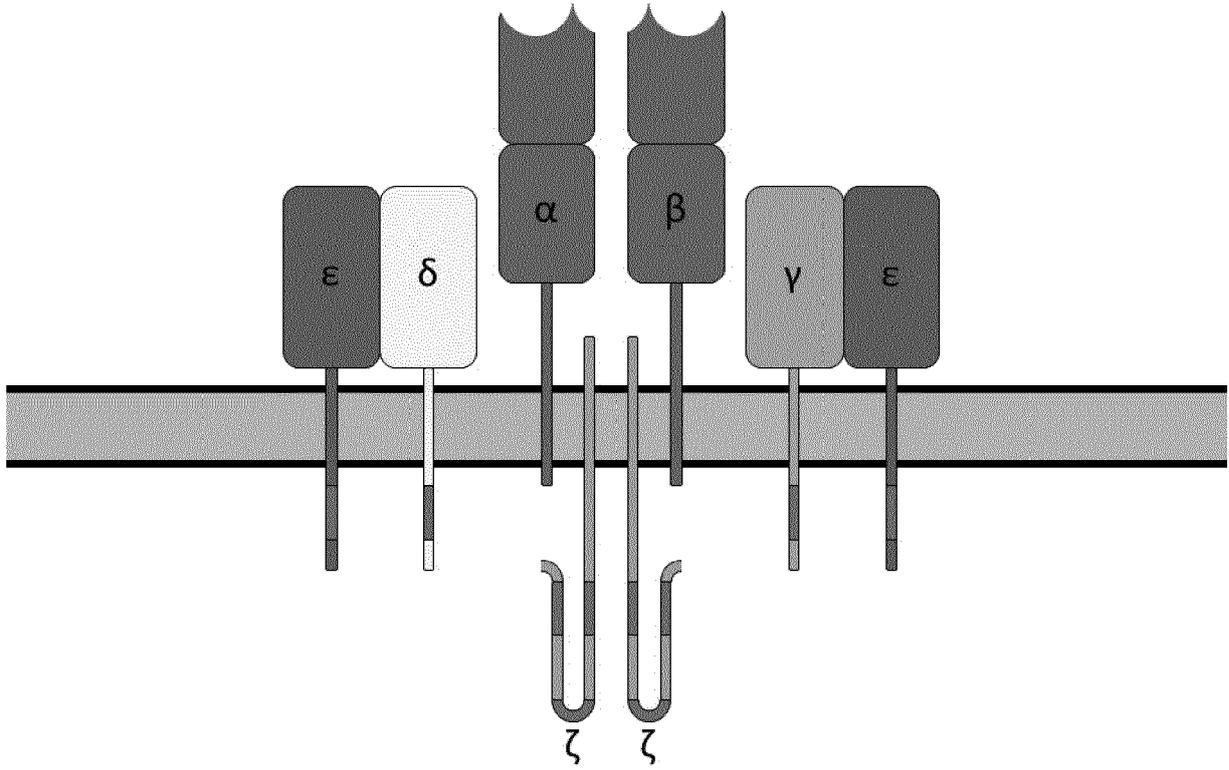


Fig. 8

Alineación de formato CLUSTAL mediante MAFFT (v7.273)

```

I12      APTS--SSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQC
IL15     NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATL-----YTESDV-----HPSC
          .. *. ** : :: : :* :      *...:      * .*

I12      LEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIV---LELKGSETTFMCEYAD--ETAT
IL15     KVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKN
          :* :  *:: . . . .  :* :.*: :.. *. :*. *  *: .: * .

I12      IVEFLNRWITFCQSIISTLT
IL15     IKEFLQSFVHIVQMFINT-S
          * ***: :: : * :*. * :
    
```

Fig. 9