

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 399**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00	(2006.01)
A61K 35/12	(2015.01)
A61K 35/17	(2015.01)
C07K 14/705	(2006.01)
C07K 14/725	(2006.01)
C12N 5/0783	(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2015 PCT/EP2015/068515**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2016 WO16026742**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2015 E 15752996 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3182994**

54 Título: **Receptor de antígeno quimérico específico para el antígeno SSEA4**

30 Prioridad:

19.08.2014 US 201462038873 P

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

17.06.2020

73 Titular/es:

**MILTENYI BIOTEC B.V. & CO. KG (100.0%)
Friedrich-Ebert-Strasse 68
51429 Bergisch Gladbach, DE**

72 Inventor/es:

**BOSIO, ANDREAS;
HARDT, OLAF y
ALOIA, ANDREA**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 767 399 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

Receptor de antígeno quimérico específico para el antígeno SSEA4

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo del tratamiento del cáncer, en particular al tratamiento del cáncer mediante el uso del antígeno SSEA4 como objetivo.

10 Antecedentes

El cáncer es un amplio grupo de enfermedades que implican el crecimiento celular no regulado. En el cáncer, las células se dividen y crecen sin control, formando tumores malignos e invadiendo partes cercanas del cuerpo. El cáncer también puede extenderse a partes más distantes del cuerpo a través del sistema linfático o el torrente sanguíneo. Hay más de 200 cánceres conocidos diferentes que afectan a los humanos. Mientras que hay buenas opciones de tratamiento disponibles para muchos tipos de cánceres, otras aún representan necesidades médicas no satisfechas. En particular, el cáncer de ovario, el carcinoma de células renales y el cáncer de mama triple negativo (TNBC) son tumores malignos con opciones terapéuticas limitadas. TNBC es un subtipo agresivo de cáncer de mama asociado con alto riesgo de metástasis y recaída temprana. Actualmente, la opción principal para la terapia sistémica de pacientes con TNBC es la quimioterapia con una eficacia general deficiente y efectos secundarios graves. Inicialmente, la mayoría de los pacientes con TNBC responden al tratamiento de quimioterapia neoadyuvante, pero solo alrededor del 20% alcanzan una respuesta patológica completa (pCR) con buen pronóstico. Notablemente, la mayoría de los pacientes no alcanzan la pCR porque los tumores tienen una menor sensibilidad de novo a la quimioterapia o desarrollan resistencia a la quimioterapia. En tales casos, los tumores retroceden debido a la quimioterapia, pero las células cancerosas residuales persisten e inician la recurrencia del tumor y la metástasis dentro de los tres años posteriores a la quimioterapia en aproximadamente el 40% de los pacientes.

El antígeno embrionario específico de la etapa de sialilglicolípido 4 (SSEA4) es un epítipo sialilglicolípido también conocido como monosialosil globopentaosilceramida (MSGb5), inicialmente identificado en células de teratocarcinoma humano (Kannagi R et al., EMBO J. 1983; 2 (12): 2355-61; Saito S et al., J Biol Chem. 18 de julio de 2003; 278 (29): 26474-9). SSEA4 se encuentra en células madre embrionarias humanas (ES) no diferenciadas, células pluripotentes inducidas (iPS), células de carcinoma embrionario (EC) y células germinales embrionarias (EG) y una variedad de células madre somáticas, tales como células madre de pulpa dental, células madre de tipo embrionarias muy pequeñas derivadas de la sangre del cordón umbilical (VSEL) y células estromales mesenquimales (Gang EJ et al., Blood. Feb 15 de 2007; 109 (4): 1743-51; Truong TT et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. Agosto 11 de 2011; 52 (9): 6315-20).

En el documento EP2927328A1 se divulga que SSEA4 es un biomarcador para marcar una subpoblación de células cancerosas resistentes a la quimioterapia.

40 La función de SSEA4 aún es desconocida.

El receptor de antígeno quimérico (CAR) proporciona un enfoque prometedor para la inmunoterapia de células adoptivas para el cáncer. Comúnmente, los CAR comprenden una variable de fragmento de cadena única (scFv) de un anticuerpo específico para un antígeno asociado a tumor (TAA) acoplado a través de regiones de bisagra y transmembrana a dominios citoplasmáticos de moléculas de señalización de células T. Las fracciones de activación de linfocitos más comunes incluyen un dominio coestimulador de células T (por ejemplo, CD28, CD137, OX40, ICOS y CD27) en conjunto con una fracción desencadenante de células T (por ejemplo, CD3ζ). La inmunoterapia adoptiva mediada por CAR permite que las células injertadas con CAR reconozcan directamente los TAA en las células tumorales objetivo de una manera no restringida por HLA.

El documento WO2014/031687A1 divulga un receptor de antígeno quimérico que tiene un dominio de unión a antígeno específico de tumor, un dominio transmembrana de CD8 y/o CD28 y un dominio intracelular de CD28, CD137 y/o CD3zeta. El documento WO2014/031687A1 enseña que la selección del dominio de unión al ligando depende del tumor a tratar.

El documento US2014/0099340 describe un receptor de antígeno quimérico que tiene un dominio de unión a antígeno específico de tumor, un dominio transmembrana de CD8 y/o CD28 y un dominio intracelular de CD28, CD137 y/o CD3zeta. El documento US2014/0099340 también enseña composiciones de CAR combinadas opcionalmente con un agente quimioterapéutico, ácidos nucleicos, vectores, células huésped y usos para el tratamiento del cáncer tal como el cáncer de ovario.

Lou, Y.-W. et al., (2014, Proceedings of the National Academy of Sciences, 111: 2482-2487) divulga que SSEA4 debe considerarse como un objetivo terapéutico para la terapia contra el cáncer. Lou, Y.-W. et al., divulga que SSEA4 se expresa en cada tipo de líneas celulares de cáncer, así como en células cancerosas de carcinoma de células de mama y renales.

Hung, T-C. et al (2013, Journal of the American Chemical Society 135: 5934-5937) divulga que FKBP4 es una proteína de unión a SSEA4 en células de cáncer de mama y que SSEA4 está implicado en malignidad, invasión y metástasis de células cancerosas. Hung, T-C. et al., especulan que la subregulación de SSEA4 podría estar vinculada a la supresión de procesos malignos de cáncer. Huang, Y.-L. et al., (2013, Proceedings of the National Academy of Sciences, 110: 2517-2522) divulga que SSEA4 se sobreexpresa en células de cáncer de mama y el desarrollo de la vacuna con SSEA4.

Aunque menos del 25% de los pacientes con cáncer de mama se benefician del tratamiento quimioterapéutico (CLIFFORD A. HUDIS y LUCA GIANNI, The Oncologist 2011; 16 (suplemento 1): 1-11), este enfoque sistémico todavía se usa como atención estándar. Debido a los efectos secundarios graves, sería muy beneficioso identificar marcadores que puedan usarse como una opción para el tratamiento de cánceres como el cáncer de mama humano.

Sumario de la invención

El SSEA4 es un antígeno de la superficie celular de las células cancerosas y, por lo tanto, puede usarse para una terapia biológica o inmunológica dirigida de las células cancerosas que expresan SSEA4, que incluyen, entre otros, cáncer de ovario, carcinoma de células renales y TNBC. Sorprendentemente, ahora se encontró que las células modificadas, las células T modificadas preferiblemente que expresan un receptor de antígeno quimérico específico para el antígeno SSEA4 son capaces de matar las células que expresan SSEA4 *in vitro* e *in vivo*. Por lo tanto, la invención se refiere a una estrategia de transferencia celular adoptiva de células transducidas para expresar un receptor de antígeno quimérico en el que dicho CAR está dirigido a SSEA4 ("SSEA4-CAR"), en el que el dominio de unión a antígeno de dicho CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, que da como resultado el reconocimiento y la unión a las células cancerosas que expresan SSEA4. Luego, la célula modificada genéticamente, es decir, la célula que expresa CAR, realiza su función específica, por ejemplo, matando las células objetivo, secretando citocinas y/o proliferando.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Estructura de un CAR que reconoce SSEA4

Figura 2: Secuencias de aminoácidos de (A) V_H -enlazador- V_L de SSEA4-CAR completo (correspondiente a la SEQ ID NO: 5) y (B) V_L -enlazador- V_H de SSEA4-CAR completo (correspondiente a la SEQ ID NO: 6).

Figura 3: Expresión de los constructos del receptor de antígeno quimérico "orientación scFv pesada-ligera" (SEQ ID NO: 5) y "orientación scFv ligera-pesada" (SEQ ID NO: 6) en la superficie de las células T de sangre periférica.

Figuras 4A, B y C: activación de células T dependientes de SSEA-4-CAR después de la estimulación con células tumorales positivas para SSEA-4 que dan como resultado la secreción de citocinas proinflamatorias IFN γ , IL-2 y TNF α

Figuras 5A y B: la muerte dependiente de SSEA-4-CAR de células tumorales positivas para SSEA-4 por células T transducidas

Descripción detallada de el invento

Sorprendentemente, se encontró que las células cancerosas que expresan SSEA4 que están directamente dirigidas por una célula inmune modificada que expresa un CAR específico para el antígeno SSEA4 se ven afectadas de manera que estas células no crecen y/o se les induce a morir.

En un primer aspecto, la invención proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a antígeno específico para SSEA4 ("SSEA4-CAR"), en el que dicho dominio de unión a antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

El dominio de unión a antígeno de un SSEA4-CAR puede comprender, por ejemplo, cadena pesada de longitud completa, fragmentos Fab, fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos bivalentes de cadena sencilla o diacuerpos, cada uno de los cuales es específico para el antígeno objetivo SSEA4.

El dominio de unión a antígeno de dicho CAR comprende un scFv que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. Dicho CAR puede comprender las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

Dicho CAR puede comprender un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular, en el que el dominio transmembrana comprende, por ejemplo, una secuencia de los dominios transmembrana derivados de CD8 α y/o CD28; y en el que el dominio de señalización intracelular comprende, por ejemplo, una secuencia derivada de los dominios de señalización intracelular de uno o más de CD28, CD137, OX40 y CD3zeta. Alternativamente, el CAR puede estar compuesto de otras partes, tales como una bisagra (véase la Figura 1) y/o puede estar compuesto como un CAR de di o multicadena como se describe a continuación.

El SSEA4-CAR puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

En un aspecto de la invención, el CAR de la invención es para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que padece cáncer, y en el que al menos una subpoblación de las células cancerosas de dicho cáncer expresa SSEA4, en el que dicho dominio de unión a antígeno de dicho CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

Dicho cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer de mama humano, carcinoma de células renales (RCC) humano y cáncer de ovario humano. Dicho cáncer puede ser TNBC.

Dicha subpoblación de células cancerosas que expresan SSEA4 puede comprender al menos 1 célula que expresa SSEA4 de todas las células cancerosas en el sujeto que padece dicho cáncer. Preferiblemente, dicha subpoblación de células cancerosas que expresan SSEA4 puede comprender al menos 1%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45% o al menos 50% de todas las células cancerosas de un sujeto que padece dicho cáncer.

En una realización preferida de la invención, la célula cancerosa que expresa SSEA4 está dirigida por una célula modificada, preferiblemente célula T, que expresa un receptor de antígeno quimérico específico para SSEA4 como se divulga en este documento, en el que dicho dominio de unión a antígeno de dicho CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. Esta célula (T) modificada se puede usar en terapia de células (T) adoptivas.

En un aspecto, la invención proporciona una población de células que comprende células genéticamente modificadas que expresan un receptor de antígeno quimérico específico para el antígeno SSEA4 (SSEA4-CAR), en el que dicho dominio de unión a antígeno de dicho CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, como se divulga en este documento. Preferencialmente, dicha población de células que comprende células genéticamente modificadas que expresan un receptor de antígeno quimérico específico para el antígeno SSEA4 (SSEA4-CAR) es una población aislada de células.

En un aspecto, la invención proporciona una población o una población aislada de células modificadas que expresan SSEA4-CAR, en el que dicho dominio de unión a antígeno de dicho CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, como se divulga en el presente documento para uso en inmunoterapia. La inmunoterapia puede ser para el tratamiento del cáncer en un sujeto que padece cáncer, en el que al menos una subpoblación de las células cancerosas de dicho cáncer expresan SSEA4.

Dicha subpoblación de células cancerosas que expresan SSEA4 puede comprender al menos 1 célula que expresa SSEA4 de todas las células cancerosas en el sujeto que padece dicho cáncer. Preferiblemente, dicha subpoblación de células cancerosas que expresan SSEA4 puede comprender al menos 1%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45% o al menos 50% de todas las células cancerosas de un sujeto que padece dicho cáncer.

En caso de necesidad, dicha población o población aislada de células modificadas se expande a una cantidad terapéuticamente efectiva de células antes de su uso en dicha inmunoterapia. Dicho cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer de mama humano, carcinoma de células renales (RCC) humano y cáncer de ovario humano. Dicho cáncer puede ser TNBC. Dichas células pueden ser células inmunes o subconjuntos de células inmunes, preferiblemente células T o subconjuntos de células T o células NK o subconjuntos de células NK.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar el cáncer que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad de células enriquecidas y modificadas que expresan SSEA-CAR como se divulga en este documento eficaz para tratar dicho cáncer. El tratamiento del cáncer puede ser en un sujeto que padece cáncer, en el que al menos una subpoblación de las células cancerosas de dicho cáncer expresan SSEA4.

Dicho cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer de mama humano, carcinoma de células renales (RCC) humano y cáncer de ovario humano. Dicho cáncer puede ser TNBC. Dichas células pueden ser células inmunes o subconjuntos de células inmunes, preferiblemente células T o subconjuntos de células T o células NK o subconjuntos de células NK.

En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende células genéticamente modificadas que expresan un CAR específico para el antígeno SSEA4, en el que dicho dominio de unión a antígeno de dicho CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, como se divulga en este documento y un portador farmacéuticamente aceptable.

Dicha composición farmacéutica puede usarse en el tratamiento del cáncer en un sujeto que padece cáncer. Dicho cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer de mama humano, carcinoma de células renales (RCC) humano y cáncer de ovario humano. Dicho cáncer puede ser TNBC. Dichas células pueden ser células inmunes o subconjuntos de células inmunes, preferiblemente células T o subconjuntos de células T o células NK o subconjuntos de células NK.

5 En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende células genéticamente modificadas que expresan SSEA-CAR, en la que dicho dominio de unión a antígeno de dicho CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, como se divulga en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable y un agente quimioterapéutico para el tratamiento combinado de dicho cáncer.

10 En un aspecto, la invención proporciona moléculas de ácidos nucleicos y constructos de ácido nucleico tales como vectores que codifican para el SSEA4-CAR, en el que dicho dominio de unión a antígeno de dicho CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, de la presente invención como se divulga en este documento.

15 La transferencia de células adoptivas usa respuestas citotóxicas basadas en células inmunes, preferiblemente células T para atacar a las células cancerosas. Las células inmunes, preferiblemente las células T que tienen una reactividad natural o genéticamente modificada al cáncer de un paciente, se generan *in vitro* y luego se transfieren nuevamente al paciente con cáncer. El receptor de antígeno quimérico proporciona un enfoque prometedor para esta inmunoterapia de células adoptivas para el cáncer. El CAR de la invención se puede modificar para comprender un dominio extracelular que tiene un dominio de unión a antígeno fusionado a un dominio de señalización intracelular de la cadena zeta del complejo del receptor del antígeno de células T, por ejemplo, CD3 zeta. Los dominios extracelulares e intracelulares pueden estar unidos directamente a través de un dominio transmembrana o los dominios extracelulares pueden fusionarse a un dominio transmembrana y los dominios intracelulares pueden fusionarse a otro dominio transmembrana. Si los dominios extra e intracelulares están unidos a dominios transmembrana separados, entonces los dominios transmembrana interactúan para la activación del I CAR (CAR dividido o CAR de cadena múltiple). Las células inmunes modificadas, preferiblemente las células T de la invención expresan un CAR de la invención que es capaz de redirigir el reconocimiento de antígeno basado en la especificidad de unión al antígeno del CAR. La especificidad del CAR es para el antígeno SSEA4 que se encuentra que se expresa en células cancerosas tales como el cáncer de mama humano, el RCC y el cáncer de ovario humano.

20 En general, un CAR puede comprender un dominio extracelular que comprende el dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. El dominio extracelular puede estar unido al dominio transmembrana por un enlazador. El dominio enlazador también puede comprender un péptido señal.

30 Un "péptido señal" se refiere a una secuencia peptídica que dirige el transporte y la localización de la proteína dentro de una célula, por ejemplo, a un cierto orgánulo celular (como el retículo endoplásmico) y/o la superficie celular.

35 Un "dominio de unión a antígeno" se refiere a la región del CAR que se une específicamente a un antígeno (y de ese modo puede dirigirse a una célula que contiene un antígeno). Los CAR de la invención pueden comprender uno o más dominios de unión a antígeno. En general, las regiones de direccionamiento en el CAR son extracelulares. El dominio de unión a antígeno puede comprender un anticuerpo o un fragmento del mismo. El dominio de unión a antígeno puede comprender, por ejemplo, una cadena pesada de longitud completa, fragmentos Fab, fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos divalentes de cadena sencilla o diacuerpos. Cualquier molécula que se una específicamente a un antígeno dado, tal como los anticuerpos o los dominios de unión a ligando de receptores naturales, puede usarse como un dominio de unión a antígeno. A menudo, el dominio de unión a antígeno es un scFv. Normalmente, en un scFv, las porciones variables de una cadena pesada y una cadena ligera de inmunoglobulina se fusionan mediante un enlazador flexible para formar un scFv. Tal enlazador puede ser, por ejemplo, el "enlazador (G₄/S₁)₃".

40 En algunos casos, es beneficioso que el dominio de unión a antígeno se derive de la misma especie en la que se usará el CAR. Por ejemplo, si se planea usarlo terapéuticamente en humanos, puede ser beneficioso para el dominio de unión a antígeno del CAR que comprenda un anticuerpo humano o humanizado o fragmento del mismo. Los anticuerpos humanos o humanizados o sus fragmentos pueden prepararse mediante una variedad de métodos bien conocidos en la técnica.

45 "Espaciador" o "bisagra" como se usa en el presente documento se refiere a la región hidrofílica que está entre el dominio de unión a antígeno y el dominio transmembrana. Los CAR de la invención pueden comprender un dominio espaciador extracelular pero también es posible pasar dicho espaciador. El espaciador puede incluir fragmentos Fc de anticuerpos o fragmentos de los mismos, regiones bisagra de anticuerpos o fragmentos de los mismos, regiones CH2 o CH3 de anticuerpos, proteínas accesorias, secuencias espaciadoras artificiales o combinaciones de los mismos. Un ejemplo destacado de un espaciador es la bisagra CD8alfa.

50 El dominio transmembrana del CAR puede derivarse de cualquier fuente natural o sintética deseada para dicho dominio. Si la fuente es natural, el dominio puede derivarse de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana. El dominio transmembrana puede derivarse, por ejemplo, de CD8alfa o CD28.

55 El dominio citoplasmático o el dominio de señalización intracelular del CAR de la invención es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmune en la que se expresa el CAR. "Función efectora" significa una función especializada de una célula, por ejemplo, en una célula T, una función efectora puede ser la actividad citolítica o la actividad auxiliar, incluida la secreción de citocinas. El dominio de señalización

intracelular se refiere a la parte de una proteína que transduce la señal de la función efectora y dirige la célula que expresa el CAR de la invención para realizar una función especializada. El dominio de señalización intracelular puede incluir cualquier parte completa o truncada del dominio de señalización intracelular de una proteína dada suficiente para transducir la señal de la función efectora.

5 Los ejemplos prominentes de dominios de señalización intracelular para uso en los CAR incluyen las secuencias citoplasmáticas del receptor de células T (TCR) y los correceptores que actúan en concierto para iniciar la transducción de señal después de la activación del receptor de antígeno.

10 En general, la activación de las células T puede estar mediada por dos clases distintas de secuencia de señalización citoplasmática, en primer lugar las que inician la activación primaria dependiente de antígeno a través del TCR (secuencias de señalización citoplasmática primaria) y, en segundo lugar, las que actúan de manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmáticas secundarias).

15 Las secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que actúan de manera estimulante pueden contener ITAM (motivos de señalización de motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina).

20 Ejemplos de ITAM que contiene secuencias de señalización citoplasmáticas primarias frecuentemente usadas en CAR son las derivadas de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. Lo más destacado es la secuencia derivada de CD3 zeta.

25 El dominio citoplasmático del CAR puede diseñarse para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta por sí mismo o combinado con cualquier otro dominio o dominios citoplasmáticos deseados. El dominio citoplasmático del CAR puede comprender una porción de cadena CD3-zeta y una región de señalización coestimuladora. La región de señalización coestimuladora se refiere a una parte del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que se requiere para una respuesta eficiente de los linfocitos a un antígeno. Ejemplos de moléculas coestimuladoras son CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3.

30 Las secuencias de señalización citoplasmáticas dentro de la parte de señalización citoplasmática del CAR pueden estar unidas entre sí en un orden aleatorio o especificado. Un enlazador oligo o polipéptido corto, que preferiblemente tiene una longitud de entre 2 y 10 aminoácidos, puede formar el enlace. Un enlazador prominente es el doblete de glicina- serina.

35 Como ejemplo, el dominio citoplasmático puede comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28. En otro ejemplo, el dominio citoplasmático puede comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD27. En otro ejemplo, el dominio citoplasmático puede comprender el dominio de señalización de CD3-zeta, el dominio de señalización de CD28 y el dominio de señalización de CD27.

40 El CAR de la invención puede diseñarse para comprender cualquier porción o parte de los dominios mencionados anteriormente como se describe en el presente documento. La especificidad del CAR de la invención mediada por el dominio de unión a antígeno es para el antígeno SSEA4, todos los demás dominios necesarios para construir un CAR funcional pueden elegirse entre las opciones mencionadas anteriormente o que son bien conocidas por el experto en la materia. El CAR de la invención puede tener la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

45 La Figura 3 muestra la expresión de los constructos del receptor de antígeno quimérico "orientación de scFv pesado_ligero" (SEQ ID NO: 5) y "orientación de scFv ligera pesada" (SEQ ID NO: 6) en la superficie de las células T de sangre periférica que incluyen linfocitos T no modificados. Las células Pan T no modificadas se aislaron de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y se cultivaron en presencia de una matriz estimulante (kit MACS® GMP TransAct CD3/CD28; Miltenyi Biotec GmbH), así como IL-2. Para la expresión permanente del receptor, los linfocitos se transdujeron en forma lentiviral con una multiplicidad de infección (MOI) de 2. La expresión de la superficie se determinó mediante citometría de flujo con anticuerpos dirigidos contra el dominio espaciador de IgG.

50 La Figura 4 ilustra la secreción inducida por CAR de las citocinas proinflamatorias IL-2 (Figura 4A), TNFalfa (Figura 4B) e IFNgamma (Figura 4C), después de la estimulación con células tumorales positivas para SSEA-4 (NTERA2). Se muestran los resultados experimentales para el constructo receptor del dominio espaciador de scFv ligero_pesado y el CH2CH3. Se cocultivaron 1×10^5 células T CAR+ con células tumorales en una proporción 1:2 durante 24 horas y posteriormente se determinaron los niveles de citocinas de IL-2, TNFalfa e IFNgamma utilizando la técnica MACSPlex (Miltenyi Biotec GmbH; los ensayos MACSPlex están diseñados para determinar las concentraciones de analitos solubles en una sola muestra. El análisis se basa en perlas de captura MACSPlex (MPx), que muestran propiedades de fluorescencia definidas y pueden identificarse utilizando técnicas estándar de citometría de flujo. Las perlas de captura MPx dentro del kit MACSPlex Citocina 12, humano y el kit de MACSPlex Citocina 10, el ratón contiene un cóctel de varias poblaciones de perlas marcadas con fluorescencia, cada una recubierta con un anticuerpo específico que reacciona con una de las citocinas respectivas dentro de la muestra). Paralelamente, las células T CAR+ se

cultivaron en ausencia de estímulo antigénico para determinar la actividad de fondo de los receptores quiméricos. Los cultivos de control de células T no modificadas con y sin células tumorales, respectivamente, sirvieron para evaluar la especificidad de la respuesta de linfocitos mediada por CAR. El experimento se realizó con dos donantes y por duplicado y se determinaron la media, así como las desviaciones estándar. El eje de la ordenada representa la concentración de la citocina respectiva en pg/mL como se determina en los sobrenadantes de cocultivo. Después del contacto con el antígeno, las células T transgénicas de ambos donantes exhiben una secreción aumentada al menos 10 veces en IL-2 (FIG 4A), TNFalfa (FIG 4B) e IFNgamma (FIG 4C), mientras que los cocultivos con células T no modificadas muestran solo una cantidad insignificante de producción de citoquinas. Además, en las muestras de prueba, en las que se cultivaron células T anti-SSEA-4-CAR sin células tumorales, la producción de citocinas está dentro del "ruido de fondo". Por lo tanto, estos resultados verifican la funcionalidad de los receptores quiméricos desarrollados que activan las células T de una manera dependiente de antígeno y específica de CAR.

La Figura 5 muestra los resultados del ensayo de citotoxicidad para la evaluación de la actividad citolítica inducida por CAR de células T CD8+ modificadas después de la estimulación con antígeno. Se muestran los resultados experimentales para el constructo del receptor que cuenta con scFv ligero_pesado y el dominio espaciador de CH2CH3.

Las células efectoras (células T CD8+ CAR+) se sembraron en placa con 1×10^4 células tumorales positivas para SSEA-4 marcadas con fluorescencia (NTERA2) en proporciones de 10:1, 5:1, 2.5:1, 1:1 y 0.5:1. Después de 24 horas de cocultivo, la cantidad de células tumorales viables se determinó por citometría de flujo y se evaluó la eficiencia de citotoxicidad para cada relación. Para la comparación de especificidad, se usaron cocultivos con células T no modificadas. El experimento se realizó con dos donantes (Figura 5A: donante # 7; Figura 5B: donante # 8) y se determinaron por cuadruplicado y la media, así como las desviaciones estándar.

Los datos se muestran como el porcentaje de citotoxicidad en comparación con las células objetivo NTERA2 incubadas en ausencia de células T (0%). Tanto para el donante # 7 (Figura 5A) como para el donante # 8 (Figura 5B) se observa una destrucción selectiva de células tumorales por células T CAR+, lo que indica que la activación de CAR no solo promueve la secreción de citocinas, sino también la actividad citotóxica.

Realizaciones

La presente invención también abarca constructos de ácidos nucleicos (ADN o ARN) que comprenden secuencias que codifican secuencias de aminoácidos de un CAR específico para SSEA4, en las que dicho dominio de unión a antígeno de dicho CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

En una realización de la invención, se genera un constructo de ADN (vector, plásmido) que codifica un CAR específico para SSEA4. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión a antígeno específico para SSEA4, en el que dicho dominio de unión a antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, se fusiona al menos a una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio transmembrana y posteriormente una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio intracelular. La construcción de tales vectores de expresión puede realizarse mediante métodos recombinantes bien conocidos en la técnica. Alternativamente, las secuencias de ácido nucleico pueden producirse sintéticamente.

En una realización de la invención, se genera una célula que expresa el CAR de la invención. El constructo de ADN que codifica el CAR de la invención puede transfectarse o transducirse a una célula huésped mediante métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, sistemas basados en virus, métodos físicos, métodos biológicos, métodos químicos). Independientemente de los métodos utilizados para integrar, preferiblemente de forma estable, el ácido nucleico que codifica el CAR de la invención, en la célula huésped, como resultado, la célula huésped expresa un CAR que es específico para SSEA4, en el que dicho dominio de unión a antígeno de dicho CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

En una realización de la invención, el CAR específico para el antígeno SSEA4, en el que dicho dominio de unión a antígeno de dicho CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, se expresa en células inmunes o subconjuntos de células inmunes.

En una realización de la invención, el CAR específico para el antígeno SSEA4, en el que dicho dominio de unión a antígeno de dicho CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, se expresa en células T o subconjuntos de células T.

En una realización de la invención, el CAR específico para el antígeno SSEA4, en el que dicho dominio de unión a antígeno de dicho CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, se expresa en células NK o subconjuntos de células NK.

En una realización de la invención, se aísla una célula modificada que expresa un CAR específico para SSEA4, en el que dicho dominio de unión a antígeno de dicho CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 (el "SSEA4-CAR") (enriquecido o separado) después del proceso de transfección/transducción para generar dicha

célula SSEA4-CAR modificada a partir de células no transfectadas/transducidas por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo tecnologías de separación basadas en fluorescencia como FACS® o métodos de separación de células magnéticas como MACS®. En algunos casos, una fuente de células inmunes, preferiblemente células T se obtienen de un sujeto. Las células inmunes, preferiblemente las células T, se pueden obtener de una variedad de fuentes, como las células mononucleares de sangre periférica (PMBC), la médula ósea, el tejido de los ganglios linfáticos, la sangre del cordón umbilical o el tejido del timo. Para el enriquecimiento de estas células se pueden usar métodos bien conocidos en la técnica, tales como la centrifugación a través de un gradiente de Ficoll^{MR} o PERCOLL^{MR} o técnicas de selección positiva/negativa como la clasificación por fluorescencia (por ejemplo, FCASort) o la clasificación magnética (por ejemplo, MACS®).

En un caso, las células T de una muestra de sangre de un sujeto están marcadas magnéticamente, por ejemplo, con una perla magnético acoplada a anticuerpos específicos para CD4 y para CD8, respectivamente, lavadas, enriquecidas magnéticamente y recolectadas. Luego, estas células T pueden modificarse para expresar el SSEA4-CAR en su superficie celular.

En una realización de la invención, las células T modificadas aisladas/enriquecidas que expresan SSEA4-CAR, en las que dicho dominio de unión a antígeno de dicho CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, antes o después de la modificación genética puede activarse y expandirse para aumentar la cantidad de células T modificadas generalmente usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, estimulación policlonal con perlas anti-CD3/anti-CD28 o nanomatrices anti-CD3/anti-CD28 (EP2711418A1). Preferiblemente, dicha cantidad de células T modificadas se incrementa hasta una cantidad terapéuticamente efectiva.

En una realización de la invención, se genera una célula que expresa el CAR, en la que dicho dominio de unión a antígeno de dicho CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. El ARN que codifica dicho CAR puede transfectarse o transducirse a una célula huésped mediante métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, sistemas basados en virus, métodos físicos, métodos biológicos, métodos químicos). En general, dicha "célula modificada por ARN" se divulga en detalle en el documento WO2013/040557. Independientemente de los métodos utilizados para integrar el ARN que codifica el CAR de la invención, en la célula huésped, como resultado, la célula huésped expresa un CAR que es específico para SSEA4. El uso de "células modificadas por ARN" conduce al hecho de que el CAR se expresa durante un tiempo limitado en la célula (expresión transitoria).

En una presente descripción, las células genéticamente modificadas que expresan SSEA4-CAR, preferiblemente células T, se generan automáticamente en un sistema de cultivo celular cerrado. Un proceso para la generación de células genéticamente modificadas, preferiblemente células T, subconjuntos de células T o progenitores de células T comprende las etapas:

- a) proporcionar una muestra celular
- b) preparación de la muestra celular por centrifugación
- c) separación magnética de la célula, preferiblemente células T, subconjuntos de células T o progenitores de células T
- d) activación de las células enriquecidas, preferiblemente células T, subconjuntos de células T o progenitores de células T utilizando agentes moduladores
- e) modificar genéticamente las células, preferiblemente células T, subconjuntos de células T o progenitores de células T para expresar SSEA4-CAR
- f) expansión de las células T genéticamente modificadas, subconjuntos de células T o progenitores de células T en una cámara de cultivo
- g) lavado de las células cultivadas, preferiblemente células T, subconjuntos de células T o progenitores de células T.

Todas estas etapas pueden realizarse en un sistema cerrado y estéril.

El proceso es especialmente adecuado para preparar células modificadas genéticamente, preferiblemente células T, subconjuntos de células T o progenitores de células T en las que las células enriquecidas, preferiblemente células T, subconjuntos de células T o progenitores de células T se modifican genéticamente mediante el uso de virus y/o vectores no virales.

Cualquiera de estas etapas puede multiplicarse, omitirse o puede ocurrir en un orden diferente.

En una descripción, los agentes moduladores se seleccionan de anticuerpos agonistas y/o citocinas.

En una divulgación en dicho proceso automatizado, las células modificadas genéticamente, preferiblemente células T, subconjuntos de células T o progenitores de células T se enriquecen mediante el etiquetado magnético de las células y la separación magnética antes o después del cultivo para obtener una mayor frecuencia de células modificadas genéticamente, preferiblemente células T, subconjuntos de células T o progenitores de células T en el producto celular final.

Como sistema cerrado y estéril para la modificación celular, se puede usar el dispositivo de procesamiento celular

completamente automatizado CliniMACS Prodigy® y los conjuntos de tubos asociados (Miltenyi Biotec GmbH, Alemania) (WO2009/072003). Este sistema cerrado cumple con los requisitos de procesamiento de grado GMP de casi cualquier tipo de productos celulares y puede permitir reducir los requisitos de sala limpia, mejorar la transferencia de tecnología y la armonización de los procesos de fabricación de células. Ha sido desarrollado para automatizar completamente y estandarizar el proceso de fabricación de agentes terapéuticos celulares. El instrumento puede realizar la carga de muestras, el lavado de células, las separaciones de células basadas en la densidad, incluida la reducción de eritrocitos y la recolección de plasma, la separación magnética, la activación celular, la modificación celular (transducción), el cultivo celular y la formulación del producto final. Permitiendo así la integración flexible de módulos de proceso ("etapas") en un flujo de trabajo cerrado, automatizado y seguro que cumpla con las GMP que reproduzca un proceso biológico complejo deseado.

En una descripción, el SSEA4-CAR de la invención se usa para el tratamiento en un sujeto que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociada con una expresión anormal de SSEA4.

En una realización de la invención, el SSEA4-CAR, en el que dicho dominio de unión a antígeno de dicho CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, es para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que padece cáncer, en el que al menos una subpoblación de las células cancerosas de dicho cáncer expresa SSEA4, como el cáncer de mama humano, el RCC y el cáncer de ovario humano. Células inmunes, por ejemplo, las células T de un sujeto están aisladas. El sujeto puede padecer dicho cáncer o puede ser un sujeto sano. Estas células se modifican genéticamente *in vitro* o *in vivo*? para expresar SSEA4-CAR. Estas células modificadas pueden activarse y expandirse *in vitro* o *in vivo*?. En una terapia celular, estas células modificadas se infunden a un receptor que las necesita. Estas células pueden ser una composición farmacéutica (dicha célula más portador farmacéuticamente aceptable). Las células infundidas son capaces de matar (o al menos detener el crecimiento de) las células cancerosas que expresan SSEA4 en el receptor. El receptor puede ser el mismo sujeto del que se obtuvieron las células (terapia celular autóloga) o puede ser de otro sujeto de la misma especie (terapia celular alogénica).

En una descripción de la invención, el sujeto que padece cáncer puede tratarse con la composición farmacéutica de la invención junto con un agente inmunomodulador, tal como, pero sin limitación, rapamicina o agentes que bloquean la señalización de PD-1/PD-L1 o CTLA4.

En una descripción, debido al hecho de que las células cancerosas que expresan SSEA4 pueden ser solo una subpoblación de las células cancerosas del sujeto, el sujeto puede tratarse adicionalmente con quimioterapia. Los agentes quimioterapéuticos adecuados para tratar cánceres son bien conocidos en la técnica. En otra divulgación, el sujeto que padece dicho cáncer puede ser tratado mediante una terapia dirigida adicional, por ejemplo, pero sin limitarse al direccionamiento de Her2 mediado por anticuerpos en lugar del tratamiento con quimioterapia. Alternativamente, el sujeto también puede tratarse con quimioterapia.

En el documento EP2927328A1 se divulga un método para evaluar el pronóstico asociado a la resistencia a la quimioterapia en un individuo que tiene cáncer, el método comprende las etapas de a) proporcionar una muestra para analizar y b) detectar la expresión de SSEA4 en la muestra de prueba, en la que la expresión de SSEA4 en la muestra de prueba es indicativa de un mal pronóstico. Por lo tanto, en una descripción se analiza al sujeto que padece cáncer (se hace un diagnóstico) con respecto al tipo de cáncer antes del tratamiento con las células modificadas de la invención. Si el análisis del cáncer indica que el cáncer comprende al menos una subpoblación de las células cancerosas que expresan SSEA4, entonces el tratamiento del sujeto que padece dicho cáncer con células modificadas con SSEA4-CAR es prometedor y aconsejable. Pero el sujeto que padece cáncer, en el que dicho cáncer no tiene células cancerosas que expresan SSEA4, también puede tratarse con las células modificadas con SSEA4-CAR de la presente invención como se divulga en el presente documento como una medida de precaución y prevención de la génesis de células cancerosas que expresan SSEA4 durante un tratamiento del sujeto que padece cáncer, por ejemplo, un tratamiento quimioterapéutico.

En una divulgación, las células que expresan SSEA4-CAR se aplican a un sujeto que padece cáncer como terapia celular como se divulga más arriba pero en combinación con un segundo CAR activador, que también se expresa en las mismas células modificadas, reconociendo un epítipo adicional para aumentar la especificidad de las células modificadas que expresan ambos CAR. Este epítipo puede estar unido a la membrana, ser parte de la matriz extracelular o ser un componente soluble.

En una realización de la invención, las células que expresan SSEA4-CAR se aplican a un sujeto que padece cáncer como terapia celular como se divulgó anteriormente pero en combinación con un segundo CAR activador, que también se expresa en las mismas células modificadas, reconociendo un epítipo adicional en las células cancerosas que expresan SSEA4 para aumentar la especificidad de las células modificadas que expresan ambos CAR. Este epítipo puede estar unido a la membrana, ser parte de la matriz extracelular o ser un componente soluble.

En una divulgación, las células que expresan SSEA4-CAR se aplican a un sujeto que padece cáncer como terapia celular como se divulgó anteriormente, pero en combinación con un segundo CAR inhibidor, que también se expresa en las mismas células modificadas, reconociendo un epítipo adicional para aumentar la especificidad de las células modificadas que expresan ambos CAR. Este epítipo puede estar unido a la membrana, ser parte de la matriz

extracelular o ser un componente soluble.

Las células inmunes, preferiblemente células T diseñadas para expresar SSEA4-CAR, pueden administrarse solas o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes tales como IL-2 u otras citocinas o poblaciones de células. Brevemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender una población celular de células genéticamente modificadas como se divulga en el presente documento, es decir, células que expresan un SSEA4-CAR, en el que dicho dominio de unión a antígeno de dicho CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, en combinación con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención están formuladas para administración intravenosa. La administración de composiciones celulares al sujeto puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente conocida en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de una manera apropiada para la enfermedad a tratar. Las dosis apropiadas pueden determinarse mediante ensayos clínicos. Pero la cantidad y frecuencia de administración también estará determinada e influenciada por factores tales como la condición del paciente y el tipo y la gravedad de la enfermedad del paciente.

Una composición farmacéutica que comprende las células inmunes, preferiblemente las células T descritas en el presente documento, se puede administrar a una dosis de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, preferiblemente de 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal. Las composiciones celulares también se pueden administrar varias veces a estas dosis. Las composiciones de células pueden inyectarse directamente en un tumor, ganglio linfático o sitio de infección.

Las células pueden activarse y expandirse a cantidades terapéuticamente efectivas usando métodos conocidos en la técnica.

Las células como se divulgan en el presente documento pueden usarse en combinación con, por ejemplo, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, anticuerpos o terapias con anticuerpos.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención.

El término "resistencia a la quimioterapia" significa que algunas de las células cancerosas (al menos una célula) del sujeto que padece cáncer están resistiendo el efecto deseado de un tratamiento quimioterapéutico.

El término "tumor" se conoce médicamente como una neoplasia. No todos los tumores son cancerosos; los tumores benignos no invaden los tejidos vecinos y no se propagan por todo el cuerpo.

El término "cáncer" se conoce médicamente como una neoplasia maligna. El cáncer es un amplio grupo de enfermedades que implican el crecimiento celular no regulado. En el cáncer, las células (células cancerosas) se dividen y crecen sin control, formando tumores malignos e invadiendo partes cercanas del cuerpo. El cáncer también puede extenderse a partes más distantes del cuerpo a través del sistema linfático o el torrente sanguíneo. Hay más de 200 cánceres conocidos diferentes que afectan a los humanos.

Los términos "quimioterapia" o "tratamiento quimioterapéutico" se refieren al tratamiento del cáncer (células cancerosas) con uno o más fármacos antineoplásicos citotóxicos ("agentes quimioterapéuticos" o "fármacos quimioterapéuticos") como parte de un régimen estandarizado. La quimioterapia se puede administrar con una intención curativa o puede tener como objetivo prolongar la vida o paliar los síntomas. A menudo se usa junto con otros tratamientos contra el cáncer, como radioterapia, cirugía y/o terapia de hipertermia. Los agentes quimioterapéuticos tradicionales actúan matando las células que se dividen rápidamente, una de las principales propiedades de la mayoría de las células cancerosas. Esto significa que la quimioterapia también daña las células que se dividen rápidamente en circunstancias normales: células en la médula ósea, el tracto digestivo y los folículos capilares. Esto da como resultado los efectos secundarios más comunes de la quimioterapia: mielosupresión (disminución de la producción de células sanguíneas, por lo tanto, también inmunosupresión), mucositis (inflamación del revestimiento del tracto digestivo) y alopecia (pérdida de cabello).

Algunos medicamentos anticancerosos más nuevos (por ejemplo, varios anticuerpos monoclonales o células modificadas como los de la presente invención) no son citotóxicos indiscriminadamente, sino que se dirigen a proteínas

que se expresan anormalmente en las células cancerosas y que son esenciales para su crecimiento. Dichos tratamientos a menudo se denominan "terapia dirigida" (a diferencia de la quimioterapia clásica) y a menudo se usan junto con agentes quimioterapéuticos tradicionales en regímenes de tratamiento antineoplásico.

5 Los tipos de fármacos quimioterapéuticos clásicos a los que se refieren los términos "fármacos quimioterapéuticos" y "quimioterapia" como se usan en el presente documento son:

Agentes alquilantes: los agentes alquilantes son el grupo más antiguo de quimioterapéuticos en uso en la actualidad. Se llaman así debido a su capacidad de alquilar muchas moléculas, incluidas proteínas, ARN y ADN. Esta capacidad de unirse covalentemente a ADN o ARN a través de su grupo alquilo es la causa principal de sus efectos anticancerígenos. Esto conduce a una forma de muerte celular programada llamada apoptosis. Los agentes alquilantes funcionarán en cualquier punto del ciclo celular y, por lo tanto, se conocen como fármacos independientes del ciclo celular. Por esta razón, el efecto en la célula depende de la dosis; la fracción de células que mueren es directamente proporcional a la dosis del fármaco. Los subtipos de agentes alquilantes son las mostazas nitrogenadas, nitrosoureas, tetrazinas, aziridinas, cisplatino y derivados, y agentes alquilantes no clásicos. Las mostazas nitrogenadas incluyen mecloretamina, ciclofosfamida, melfalan, clorambucilo, ifosfán y busulfán. Las nitrosoureas incluyen N-Nitroso-N-metilurea (MNU), carmustina (BCNU), lomustina (CCNU) y semustina (MeCCNU), fotemustina y estreptozotocina. Las tetrazinas incluyen dacarbazina, mitozolomida y temozolomida. Las aziridinas incluyen tiotepa, mitomicina y diaziquona (AZQ). El cisplatino y sus derivados incluyen cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. Alteran la función celular al formar enlaces covalentes con los grupos amino, carboxilo, sulfhidrilo y fosfato en moléculas biológicamente importantes. Los agentes alquilantes no clásicos incluyen procarbazona y hexametilmelamina. Mafosfamida es un agente alquilante de oxazafosforina (similar a la ciclofosfamida) bajo investigación como fármaco quimioterapéutico.

Antimetabolitos: los términos "antimetabolitos" e "inhibidores de la síntesis y transcripción de ADN", como se usan en el presente documento, tienen un significado intercambiable y definen un grupo de moléculas que impiden la síntesis de ADN y ARN. Muchos de ellos tienen una estructura similar a los bloques de construcción de ADN y ARN. Los antimetabolitos se parecen a nucleobases o nucleósidos, pero tienen grupos químicos alterados. Estos medicamentos ejercen su efecto bloqueando las enzimas requeridas para la síntesis de ADN o incorporándose en el ADN o el ARN. Al inhibir las enzimas involucradas en la síntesis de ADN, evitan la mitosis porque el ADN no puede duplicarse. Además, después de la incorporación incorrecta de las moléculas en el ADN, puede producirse daño en el ADN y se induce la muerte celular programada (apoptosis). A diferencia de los agentes alquilantes, los antimetabolitos dependen del ciclo celular. Esto significa que solo funcionan durante una parte específica del ciclo celular, en este caso la fase S (la fase de síntesis de ADN). Por esta razón, a una dosis determinada, el efecto se estabiliza y proporcionalmente no se produce más muerte celular con mayores dosis. Los subtipos de los antimetabolitos son los antifolatos, fluoropirimidinas, análogos de desoxinucleósidos y tiopurinas. Los antifolatos incluyen metotrexato y pemetrexed. Las fluoropirimidinas incluyen fluorouracilo y capecitabina. El fluorouracilo es un análogo de nucleobase que se metaboliza en las células para formar al menos dos productos activos; monofosfato de 5-fluorouridina (FUMP) y 5'-fosfato de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (fdUMP). FUMP se incorpora al ARN y fdUMP inhibe la enzima timidilato sintasa; ambos conducen a la muerte celular. La capecitabina es un profármaco de 5-fluorouracilo que se descompone en las células para producir el fármaco activo. Los análogos de desoxinucleósidos incluyen citarabina, gemcitabina, decitabina, vidaza, fludarabina, nelarabina, cladribina, clofarabina y pentostatina. Las tiopurinas incluyen tioguanina y mercaptopurina.

Agentes antimicrotúbulos: los agentes antimicrotúbulos son productos químicos derivados de plantas que bloquean la división celular al evitar la función de los microtúbulos. Los alcaloides de la vinca y los taxanos son los dos grupos principales de agentes antimicrotúbulos. Los alcaloides de la vinca evitan la formación de los microtúbulos, mientras que los taxanos evitan el desmontaje de los microtúbulos. Al hacerlo, evitan que las células cancerosas completen la mitosis. Después de esto, se produce la detención del ciclo celular, que induce la muerte celular programada (apoptosis). Los alcaloides de la vinca se derivan del bígamo de Madagascar, *Catharanthus Roseus*. Los taxanos son fármacos naturales y semisintéticos. El primer fármaco de su clase, el paclitaxel, se extrajo originalmente del árbol de tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia*. Ahora este fármaco y otro en esta clase, docetaxel, se producen de forma semisintética a partir de un químico que se encuentra en la corteza de otro árbol de tejo; *Taxusbaccata*. Estos fármacos promueven la estabilidad de los microtúbulos, evitando su desmontaje. El docetaxel ejerce su efecto durante la fase S.

Inhibidores de la topoisomerasa: los inhibidores de la topoisomerasa son fármacos que afectan la actividad de dos enzimas; topoisomerasa I y topoisomerasa II. Cuando se desenrolla la hélice bicatenaria del ADN, por ejemplo, durante la replicación o traducción del ADN, el ADN adyacente sin abrir se enrolla más fuerte (superenrollamientos), como abrir el centro de una cuerda retorcida. El estrés causado por este efecto es en parte ayudado por las enzimas topoisomerasa. Producen rupturas de cadena sencilla o doble en ADN, lo que reduce la tensión en la cadena de ADN. Esto permite que se produzca el desenrollado normal del ADN durante la replicación o traducción. La inhibición de la topoisomerasa I o II interfiere con ambos procesos. Dos inhibidores de la topoisomerasa I, irinotecano y topotecano, se derivan semisintéticamente de la camptotecina, que se obtiene del árbol ornamental chino *Camptotheca acuminata*. Los medicamentos que se dirigen a la topoisomerasa II se pueden dividir en dos grupos. Los venenos de topoisomerasa II causan niveles elevados de enzimas unidas al ADN. Esto evita la replicación y traducción del ADN, provoca roturas de la cadena de ADN y conduce a la muerte celular programada (apoptosis). Estos agentes incluyen etopósido, doxorubicina, mitoxantrona y tenipósido. El segundo grupo, los inhibidores catalíticos, son fármacos que

bloquean la actividad de la topoisomerasa II y, por lo tanto, evitan la síntesis y traducción del ADN porque el ADN no puede desenrollarse adecuadamente. Este grupo incluye novobiocina, merbarona y aclarubicina.

Antibióticos citotóxicos: los antibióticos citotóxicos son un grupo variado de fármacos que tienen diversos mecanismos de acción. El grupo incluye las antraciclinas y otros fármacos que incluyen actinomicina, bleomicina, plicamicina y mitomicina. La doxorubicina y la daunorrubicina fueron las dos primeras antraciclinas, y se obtuvieron de la bacteria *Streptomyces peucetius*. Los derivados de estos compuestos incluyen epirubicina e idarrubicina. Otros fármacos usados clínicamente en el grupo de antraciclinas son pirarrubicina, aclarubicina y mitoxantrona. Los mecanismos de las antraciclinas incluyen la intercalación de ADN (moléculas insertadas entre las dos cadenas de ADN), la generación de radicales libres altamente reactivos que dañan las moléculas intercelulares y la inhibición de la topoisomerasa. La actinomicina es una molécula compleja que intercala ADN y evita la síntesis de ARN. La bleomicina, un glicopéptido aislado de *Streptomyces verticillus*, también intercala ADN, pero produce radicales libres que dañan el ADN. Esto ocurre cuando la bleomicina se une a un ion metálico, se reduce químicamente y reacciona con el oxígeno. La mitomicina es un antibiótico citotóxico con la capacidad de alquilar ADN.

La quimioterapia de combinación implica tratar a un paciente con varios fármacos diferentes simultáneamente. Los fármacos difieren en su mecanismo y efectos secundarios. La mayor ventaja es minimizar las posibilidades de desarrollar resistencia a cualquier agente. Además, los medicamentos a menudo se pueden usar en dosis más bajas, lo que reduce la toxicidad. Un ejemplo destacado es la combinación de doxorubicina y ciclofosfamida (A/C).

La "resistencia a la quimioterapia" se produce cuando las células cancerosas no son inhibidas o destruidas por el tratamiento, al menos a la concentración aplicada. En otras palabras, las células cancerosas resisten los efectos de la quimioterapia. El término "sensibilidad a la quimioterapia" tiene un significado correspondiente.

El término "autólogo", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier material derivado del mismo sujeto al que se reintroduce más tarde.

El término "allogénico" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier material derivado de un sujeto diferente de la misma especie que el sujeto a quien se reintroduce el material.

El término "cantidad terapéutica efectiva" significa una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico.

El término "aislado" significa alterado o removido del estado natural. Por ejemplo, una población de células aislada significa un enriquecimiento de dichas células y la separación de otras células que normalmente están asociadas en su estado natural con dichas células aisladas. Una población de células aislada significa una población de células sustancialmente purificadas que son una población de células homogéneas.

Los términos "se une específicamente" o "específico para" con respecto a un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo, de un fragmento del mismo o de un CAR se refieren a un dominio de unión a antígeno que reconoce y se une a un antígeno específico, pero no reconoce o une sustancialmente otras moléculas en una muestra. Un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno de una especie puede unirse también a ese antígeno de otra especie. Esta reactividad entre especies no es contraria a la definición de ese dominio de unión a antígeno como específico. Un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno puede unirse también a diferentes formas alélicas del antígeno (variantes alélicas, variantes de empalme, isoformas, etc.). Esta reactividad cruzada no es contraria a la definición de ese dominio de unión a antígeno como específico.

Los términos "célula modificada" y "célula modificada genéticamente" como se usan en el presente documento pueden usarse indistintamente. Los términos significan que contiene y/o que expresa un gen foráneo o una secuencia de ácido nucleico que a su vez modifica el genotipo o el fenotipo de la célula o su progenie. Especialmente, los términos se refieren al hecho de que las células, preferiblemente las células T, pueden manipularse mediante métodos recombinantes bien conocidos en la técnica para expresar péptidos o proteínas estables o transitorios que no se expresan en estas células en estado natural. Por ejemplo, las células T se modifican para expresar un constructo artificial tal como un receptor de antígeno quimérico en su superficie celular. Por ejemplo, las secuencias de CAR pueden administrarse en las células usando un vector retroviral o lentiviral.

Las secuencias de aminoácidos de V_H de SSEA4, V_L de SSEA4, V_H -enlazador- V_L de scFv, V_L -enlazador- V_H de scFv, V_H -enlazador- V_L SSEA4-CAR y V_L -enlazador- V_H de SSEA4-CAR se proporcionan en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente (en el código de aminoácidos de una letra). Las secuencias de aminoácidos (proteínas, polipéptidos) que se proporcionan en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 6 se refieren a todas las constelaciones de la secuencia de aminoácidos respectiva que retiene la función prevista de la secuencia de aminoácidos respectiva como se define en el presente documento. En otras palabras, las divergencias con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente, no deberían afectar a su potencial como unión específica al antígeno SSEA4 y/o ser un CAR funcional. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 pueden ser la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6, respectivamente. También puede ser una variante de la misma que tiene algunos aminoácidos eliminados, añadidos o reemplazados mientras conserve la

función prevista como se divulga en el presente documento. Por lo tanto, se incluyen en esta definición variantes de las secuencias de aminoácidos en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente, tales como secuencias de aminoácidos esencialmente similares a la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, respectivamente, que tienen una identidad de secuencia de al menos 70 %, o al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% a nivel de la secuencia de aminoácidos. En el contexto de la presente invención, la "identidad de secuencia" puede determinarse usando alineamientos por pares usando programas de alineamientos para secuencias de aminoácidos bien conocidas en la técnica.

Las células T o los linfocitos T son un tipo de linfocitos que juegan un papel central en la inmunidad mediada por células. Se pueden distinguir de otros linfocitos, como las células B y las células asesinas naturales (células NK), por la presencia de un receptor de células T (TCR) en la superficie celular. Existen varios subconjuntos de células T, cada uno con una función distinta.

Las células T auxiliares (células T_H) ayudan a otros glóbulos blancos en procesos inmunológicos, que incluyen la maduración de células B en células plasmáticas y células B de memoria, y la activación de células T citotóxicas y macrófagos. Estas células también se conocen como células T CD4⁺ porque expresan la glucoproteína CD4 en su superficie. Las células T auxiliares se activan cuando las moléculas MHC de clase II las presentan con antígenos peptídicos, que se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC). Una vez activados, se dividen rápidamente y secretan pequeñas proteínas llamadas citocinas que regulan o ayudan en la respuesta inmune activa. Estas células pueden diferenciarse en uno de varios subtipos, incluidos T_H1, T_H2, T_H3, T_H17, Th9 o T_{FH}, que secretan diferentes citocinas para facilitar un tipo diferente de respuesta inmune. La señalización desde el APC dirige las células T a subtipos particulares.

Las células T citotóxicas (células T_c o CTL) destruyen las células infectadas por virus y las células tumorales, y también están implicadas en el rechazo del trasplante. Estas células también se conocen como células T CD8⁺ ya que expresan la glicoproteína CD8 en su superficie. Estas células reconocen sus objetivos al unirse al antígeno asociado con las moléculas de MHC de clase I, que están presentes en la superficie de todas las células nucleadas.

Las células T de memoria son un subconjunto de células T específicas de antígeno que persisten a largo plazo después de que se resuelve una infección. Se expanden rápidamente a un gran número de células T efectoras al volver a exponerse a su antígeno afín, lo que proporciona al sistema inmunitario "memoria" contra infecciones pasadas. Las células T de memoria comprenden tres subtipos: células T de memoria central (células T_{CM}) y dos tipos de células T efectoras de memoria (células T_{EM} y células T_{EMRA}). Las células de memoria pueden ser CD4⁺ o CD8⁺. Las células T de memoria típicamente expresan la proteína de la superficie celular CD45RO. Las células T reguladoras (células T_{reg}), antes conocidas como células T supresoras, son cruciales para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Su función principal es apagar la inmunidad mediada por células T hacia el final de una reacción inmune y suprimir las células T autorreactivas que escaparon al proceso de selección negativa en el timo.

Se han descrito dos clases principales de células T_{reg} CD4⁺: las células T_{reg} Foxp3⁺ y las células T_{reg} Foxp3⁻.

Las células T asesinas naturales (células NKT, que no deben confundirse con las células asesinas naturales del sistema inmune innato) unen el sistema inmune adaptativo con el sistema inmune innato. A diferencia de las células T convencionales que reconocen los antígenos peptídicos presentados por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), las células NKT reconocen el antígeno glicolípido presentado por una molécula llamada CD1d. Una vez activadas, estas células pueden realizar funciones atribuidas a las células T_H y T_c (es decir, producción de citocinas y liberación de moléculas citolíticas/destructoras de células).

La inmunoterapia es un término médico definido como el "tratamiento de la enfermedad mediante la inducción, potenciación o supresión de una respuesta inmune". Las inmunoterapias diseñadas para provocar o amplificar una respuesta inmune se clasifican como inmunoterapias de activación, mientras que las inmunoterapias que reducen o suprimen se clasifican como inmunoterapias de supresión. La inmunoterapia contra el cáncer como una inmunoterapia activadora intenta estimular el sistema inmunitario para rechazar y destruir tumores. La transferencia celular adoptiva utiliza respuestas citotóxicas basadas en células, preferiblemente basadas en células T, para atacar las células cancerosas. Las células T que tienen una reactividad natural o genéticamente modificada al cáncer de un paciente se generan *in vitro* y luego se transfieren nuevamente al paciente con cáncer.

El término "tratamiento" como se usa en el presente documento significa reducir la frecuencia o gravedad de al menos un signo o síntoma de una enfermedad.

El término "biomarcador" o "marcador" está muy extendido en la técnica y puede denotar ampliamente una molécula biológica y/o una porción detectable de la misma (por ejemplo, un ácido nucleico, un péptido o un lípido tal como un glicolípido) cuya evaluación cuantitativa y/o cualitativa en un individuo es predictiva o informativa (por ejemplo, predictiva, de diagnóstico y/o pronóstico) con respecto a uno o más aspectos del fenotipo y/o genotipo del individuo, tal como, por ejemplo, con respecto al estado de el individuo. Por ejemplo, el biomarcador es predictivo o informativo con respecto al resultado del tratamiento quimioterapéutico de un cáncer en un individuo. Un biomarcador se expresa ("expresión del biomarcador") si el biomarcador es detectable con métodos conocidos en la técnica. Por lo tanto, la

expresión de biomarcadores abarca no solo la expresión a nivel de ácido nucleico (ADN y/o ARN) y el nivel de proteína, sino también la expresión (presencia) de otras estructuras biológicas en o en las células, tal como los glicolípidos o la actividad de una proteína.

5 Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un animal. Preferiblemente, el sujeto es un mamífero tal como ratón, rata, vaca, cerdo, cabra, pollo, mono o humano. Más preferiblemente, el individuo es un ser humano. El sujeto puede ser un sujeto que padece una enfermedad como el cáncer (un paciente), pero el sujeto también puede ser un sujeto sano.

10 El término "objetivo", como se usa en el presente documento, se refiere a un antígeno o epítipo asociado con una célula que debería reconocerse específicamente por un dominio de unión a antígeno, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo o de un CAR. El antígeno o el epítipo pueden unirse a la superficie celular pero también secretarse, parte de la membrana extracelular, o desprenderse de la célula.

15 El término "subpoblación de células cancerosas" como se usa en el presente documento se refiere al hecho de que las células cancerosas de un cáncer de un sujeto pueden ser heterogéneas. Como se muestra en el documento EP2927328A1 en algunos cánceres, algunas células cancerosas expresan SSEA4 en su superficie celular, otras no. Por lo tanto, las células cancerosas de un cáncer de un sujeto que expresa SSEA4 son una subpoblación (o una fracción) de células cancerosas dentro del cáncer de dicho sujeto. La subpoblación puede comprender al menos una célula dentro de todas las células cancerosas del cáncer del sujeto. La subpoblación puede comprender al menos 1%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, a al menos 45% o al menos 50% de todas las células cancerosas de un sujeto que padece de dicho cáncer.

25 El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento se refiere a anticuerpos policlonales o monoclonales y fragmentos de los mismos, que pueden generarse mediante métodos bien conocidos por el experto en la materia. El anticuerpo puede ser de cualquier especie, por ejemplo, murino, rata, oveja, humano. Para fines terapéuticos, si se van a utilizar fragmentos de unión a antígeno no humanos, estos pueden humanizarse mediante cualquier método conocido en la técnica.

30 Los anticuerpos también pueden ser anticuerpos modificados (por ejemplo, oligómeros, anticuerpos reducidos, oxidados y marcados).

Ejemplos

35 Los siguientes ejemplos están destinados a una explicación más detallada de la invención pero sin restringir la invención a estos ejemplos.

Ejemplo 1: Secuencia de aminoácidos del anticuerpo específico de SSEA4

40 Las secuencias de aminoácidos de las porciones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de inmunoglobulina del anticuerpo usado que se une específicamente a SSEA4 fueron como se proporcionan en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, respectivamente.

45 Estas secuencias o cualquier secuencia derivada de las mismas con una especificidad para SSEA4 se pueden usar para generar un SSEA4 que reconozca CAR. Las secuencias dadas en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 son solo ejemplos de secuencias que son específicas para el antígeno SSEA4 (las secuencias se proporcionan en un código para aminoácidos de una letra). Se pueden usar otras secuencias para generar dominios de unión a antígeno de un anticuerpo o de un CAR que también son específicos para el antígeno SSEA4.

50 Ejemplo 2: Estructura de un SSEA4 que reconoce CAR

Los enlazadores utilizados pueden comprender un epítipo/etiqueta que permite la detección del CAR como se muestra en la Figura 1. Ejemplos para epítopos/etiquetas son YOL, cMYC o HIS. El fragmento de unión específico anti-SSEA4 se deriva de un anticuerpo específico para SSEA4. La región bisagra se puede derivar, por ejemplo, de dominios IgG, CD8 α o CD28 y puede comprender un epítipo/etiqueta que permite la detección del CAR. El dominio transmembrana puede derivarse, por ejemplo, de CD8 α o CD28 seguido de uno a tres dominios de señalización. Estos dominios pueden derivarse, por ejemplo, de CD28, 4-1BB, OX40 o CD3 zeta.

Como secuencias específicas se usaron las siguientes secuencias.

60 Para el dominio de unión a antígeno de los scFv de SSEA4-CAR se usaron las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4 (las secuencias se dan en un código de aminoácidos de una letra).

65 La SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 6 (véanse también las secuencias en la Figura 2) representan secuencias de aminoácidos completas (las secuencias se proporcionan en un código de aminoácidos de una letra) de un CAR específico para el antígeno SSEA4.

Ejemplo 3: Generación de vectores de expresión lentivirales

Los SSEA4-CAR se clonaron en constructos de vectores lentivirales SIN de tercera generación bajo el control del promotor PGK humano. La transfección transitoria de las células HEK 293T con este plásmido de expresión y otros plásmidos que codifican las proteínas estructurales gag-pol, rev y la proteína de envoltura VSV-G dio como resultado la liberación de partículas de vectores virales en el sobrenadante. Las partículas del vector viral se enriquecieron posteriormente por centrifugación a baja velocidad y se almacenaron a -70 ° C.

Ejemplo 4: Separación de células T y modificación genética con SSEA4-CAR

Las células T primarias se aislaron de la aféresis del donante o muestras de la capa leucocitaria usando MicroBeads y MACS technology® (Miltenyi Biotec GmbH, Alemania) para alcanzar purezas de más del 90% (células CD3⁺). Las células enriquecidas magnéticamente fueron lavadas y resuspendidas en medio TexMACS suplementado con 200 UI/mL de IL-2 humana recombinante (Miltenyi Biotec GmbH, Alemania). Las células T se estimularon luego mediante la adición del reactivo GMP TransAct CD3/CD28 (Miltenyi Biotec GmbH, Alemania).

Después de 24 horas, se confirmó la estimulación exitosa de las células T mediante tinción de las células T con anticuerpos CD25 y CD69 y análisis por citometría de flujo en un analizador MACSQuant (Miltenyi Biotec GmbH, Alemania). Las células T estimuladas se transdujeron luego mediante la adición de vectores lentivirales que codifican SSEA4-CAR a una MOI = 0,5-2. Después de 4 días de cultivo estático, las células se lavaron para eliminar el exceso de vector viral y reactivo TransAct y se cultivaron durante otros 5-10 días. La eficacia de la transducción viral se midió tiñendo la expresión superficial de SSEA4-CAR entre células CD3⁺ vivas usando fluorocromo Fc antihumano y citometría de flujo. El número de células T marcadas con genes varió entre 10 y 60%, dependiendo de la MOI utilizada.

Ejemplo 5: Funcionalidad de SSEA4-CAR

Las células objetivo que expresan SSEA4 o las células que no expresan SSEA4 se incubaron durante 5 horas con células T expandidas que expresan SSEA4-CAR o, como control, con células T no transducidas a diferentes relaciones de efector con respecto a células objetivo. La muerte de células objetivo específicas se analizó por citometría de flujo.

Alternativamente, las células efectoras se reestimularon con líneas celulares que eran positivas o negativas para SSEA4. La producción de citocinas (IFN- γ , IL-2, TNF- α), así como la desgranulación (CD107a) se analizaron por citometría de flujo. Solo las células T que portaban el SSEA4-CAR fueron capaces de matar las células objetivo, mostraron una mayor producción de citocinas, así como una sobreexpresión del marcador de desgranulación.

Listado de secuencias

SEQ ID NO: 1
V_H de SSEA4

QVQLKESGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSL S QGVYWVRQP PGKGLEWLGA
IWAGGSTNYN SALMSRLSIS KDNSKSVQFL KMNSLQTTDDT AMYYCARVDG
YRGNMDYWG QGTSVTVSS

SEQ ID NO: 2
V_L de SSEA4

ENVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMHWYQQKSS TSPKLWIYDT
SKLASGVPGR FSGSGGNSY SLTISSMEAE DVATYYCFQG SGYPLTFGAG TKLELK

SEQ ID NO: 3
V_H-enlazador-V_L de scFv

QVQLKESGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSL S QGVYWVRQP PGKGLEWLGA
IWAGGSTNYN SALMSRLSIS KDNSKSVQFL KMNSLQTTDDT AMYYCARVDG
YRGNMDYWG QGTSVTVSSG GGGSGGGSG GGGSENVLTQ SPAIMSASPG
EKVTMTCSAS SSVSYMHWYQ QKSSTSPKLW IYDTSKLAGS VPGRFSGSGS
GNSYSLTISS MEAEDVATYY CFQGSYPLT FGAGTKLELK

SEQ ID NO: 4

ES 2 767 399 T3

V_L-enlazador-V_H de scFv

ENVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCASASSVS YMHWYQQKSS TSPKWLWIYDT
SKLASGVPGR FSGSGSGNSY SLTISSMEAE DVATYYCFQG SGYPLTFGAG
TKLELKGGGG SGGGSGGGG SQVQLKESGP GLVAPSQSLS ITCTVSGFSL
SSQGVYWVRQ PPGKGLEWLG AIWAGGSTNY NSALMSRLSI SKDNSKSQVF
LKMNSLQTD TAMYCARVD GYRGYNMDYW GQGTSVTVSS

5 SEQ ID NO: 5

Secuencia completa de CAR: V_H-enlazador-V_L de SSEA4-CAR

MDFQVQIFSF LLISASVIMS RQVQLKESGP GLVAPSQSLS ITCTVSGFSL
SSQGVYWVRQ PPGKGLEWLG AIWAGGSTNY NSALMSRLSI SKDNSKSQVF
LKMNSLQTD TAMYCARVD GYRGYNMDYW GQGTSVTVSS GGGSGGGGS
GGGSENVLT QSPAIMSASP GEKVTMTCSA SSSVSYMHWY QQKSSTSPKL
WIYDTSKLAS GVPGRFSGSG SGNSYSLTIS SMEAEDVATY YCFQGSYPL
TFGAGTKLEL KAAALPAEPK SPDKTHTCPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD
TLMIARTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
TLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD
SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSSLSPGKK
IYIWAPLAGT CGVLLLSLVI TLYCKRGRKK LLYIFKQPFM RPVQTTQEED
GCSCRFP EEE EGGCELLRVK FRSADAPAY QQGQNQLYNE LNLGRREEYD
VLDKRRGRDP EMGGKPRRKN PQEGLYNELQ KDKMAEAYSE IGMKGERRRG
KGHDGLYQGL STATKDTYDA LHMQUALPPR

10 SEQ ID NO: 6

Secuencia completa de CAR: V_L-enlazador-V_H de SSEA4-CAR

MDFQVQIFSF LLISASVIMS RENVLTQSPA IMSASPGEKV TMTCSASSSV
SYMHWYQQKS STSPKWLWIYD TSKLASGVPGR FSGSGSGNS YSLTISSMEA
EDVATYYCFQ GSGYPLTFGA GTKLELKGGG GSGGGSGGG GSQVQLKESG
PGLVAPSQSL SITCTVSGFS LSSQGVYWVR QPPGKGLEWL GAIWAGGSTN

15

YNSALMSRLS ISKDNSKSQV FLKMNSLQTD DTAMYCARV DGYRGYNMDY
WGQTSVTVS SAAALPAEPK SPDKTHTCPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD
TLMIARTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
TLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD
SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSSLSPGKK
IYIWAPLAGT CGVLLLSLVI TLYCKRGRKK LLYIFKQPFM RPVQTTQEED
GCSCRFP EEE EGGCELLRVK FRSADAPAY QQGQNQLYNE LNLGRREEYD
VLDKRRGRDP EMGGKPRRKN PQEGLYNELQ KDKMAEAYSE IGMKGERRRG
KGHDGLYQGL STATKDTYDA LHMQUALPPR

Listado de secuencias

<110> Miltenyi Biotec GmbH

5 <120> Receptor de antígeno quimérico específico para el antígeno SSEA4

<130> Mil_073PCT

<160> 6

10

<170> BISSAP 1.2

<210> 1

<211> 119

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V_H de SSEA4

20

<400> 1

```

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1          5          10
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Gln
          20          25          30
Gly Val Tyr Trp Val Arg Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
          35          40          45
Gly Ala Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
          50          55          60
Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65          70          75          80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
          85          90          95
Arg Val Asp Gly Tyr Arg Gly Tyr Asn Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
          100          105          110
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
          115
    
```

25 <210> 2

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> V_L de SSEA4

<400> 2

```

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1          5          10
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
          20          25          30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
          35          40          45
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60
Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65          70          75          80
Asp Val Ala Thr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
          85          90          95
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
          100          105
    
```

35

<210> 3

ES 2 767 399 T3

<211> 240
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> V_H-enlazador-V_L de scFv

<400> 3

```

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1          5          10          15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Gln
20          25          30
Gly Val Tyr Trp Val Arg Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35          40          45
Gly Ala Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
50          55          60
Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65          70          75          80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85          90          95
Arg Val Asp Gly Tyr Arg Gly Tyr Asn Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100         105         110
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115         120         125
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
130         135         140
Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
145         150         155         160
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser
165         170         175
Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
180         185         190
Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
195         200         205
Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
210         215         220
Ser Gly Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
225         230         235         240
    
```

10

<210> 4
 <211> 240
 <212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> V_L-enlazador-V_H de scFv

20

<400> 4

```

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1          5          10          15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20          25          30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35          40          45
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
50          55          60
Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65          70          75          80
Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
85          90          95
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    
```

ES 2 767 399 T3

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

<210> 5
 <211> 679
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia complete de CAR: V_H-enlazador-V_L de SSEA4-CAR

10

<400> 5

Met	Asp	Phe	Gln	Val	Gln	Ile	Phe	Ser	Phe	Leu	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser	
1			5						10					15		
Val	Ile	Met	Ser	Arg	Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	
			20					25					30			
Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	
		35					40					45				
Ser	Leu	Ser	Ser	Gln	Gly	Val	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	
	50				55						60					
Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Ala	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	
65					70					75					80	
Asn	Ser	Ala	Leu	Met	Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	
			85						90					95		
Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	
			100					105						110		
Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Asp	Gly	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Asn	Met	Asp	
		115					120					125				
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
	130					135						140				
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Asn	Val	Leu	Thr	
145					150					155					160	
Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	
				165					170					175		
Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	
			180					185						190		
Lys	Ser	Ser	Thr	Ser	Pro	Lys	Leu	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	
		195					200					205				
Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Gly	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Asn	Ser	
	210					215						220				
Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	
225					230					235					240	
Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	
			245						250					255		
Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Ala	Ala	Ala	Leu	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	
			260					265						270		

ES 2 767 399 T3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 275 280 285
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 290 295 300
 Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 305 310 315 320
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 325 330 335
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 340 345 350
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 355 360 365
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 370 375 380
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 385 390 395 400
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 405 410 415
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 420 425 430
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 435 440 445
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 450 455 460
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 465 470 475 480
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Ser Leu Ser
 485 490 495
 Pro Gly Lys Lys Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
 500 505 510
 Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 515 520 525
 Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 530 535 540
 Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 545 550 555 560
 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
 565 570 575
 Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
 580 585 590
 Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
 595 600 605
 Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 610 615 620
 Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
 625 630 635 640
 Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
 645 650 655
 Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
 660 665 670
 Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 675

<210> 6

<211> 679

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia complete de CAR: V_L-enlazador-V_H de SSEA4-CAR

10

<4> 6

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

ES 2 767 399 T3

1				5				10						15		
Val	Ile	Met	Ser	Arg	Glu	Asn	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	
			20					25					30			
Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	
		35					40					45				
Ser	Val	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Ser	Thr	Ser	Pro	
	50					55					60					
Lys	Leu	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Gly	
65					70					75					80	
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Asn	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	
				85					90					95		
Ser	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	
			100					105					110			
Gly	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	
		115					120					125				
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	
	130					135					140					
Gln	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	
145					150					155					160	
Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Ser	Gln	Gly	Val	
				165					170					175		
Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Ala	
		180						185					190			
Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Met	Ser	Arg	
		195					200					205				
Leu	Ser	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	
	210					215					220					
Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	
225					230					235					240	
Asp	Gly	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Asn	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	
				245					250					255		
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Leu	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	
			260					265					270			
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	
		275					280					285				
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
	290					295					300					
Ala	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
305					310					315					320	
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
				325					330					335		
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
			340					345					350			
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
		355					360					365				
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
	370					375					380					
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
385					390					395					400	
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
				405					410					415		
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
		420						425					430			
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
		435					440					445				
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
	450					455					460					
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
465					470					475					480	
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Ser	Leu	Ser	
				485					490					495		
Pro	Gly	Lys	Lys	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	
			500					505					510			

ES 2 767 399 T3

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 515 520 525
 Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 530 535 540
 Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 545 550 555 560
 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
 565 570 575
 Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
 580 585 590
 Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
 595 600 605
 Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 610 615 620
 Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
 625 630 635 640
 Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
 645 650 655
 Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
 660 665 670
 Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 675

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a antígeno específico para SSEA4, en el que dicho dominio de unión a antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
- 10 2. El CAR de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el CAR comprende un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular, en el que el dominio transmembrana comprende una secuencia de los dominios transmembrana de CD8 y/o CD28; y en el que el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de los dominios de señalización intracelular de uno o más de CD28, CD137 y CD3zeta.
- 15 3. El CAR de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.
- 20 4. El CAR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que padece cáncer, y en el que al menos una subpoblación de las células cancerosas de dicho cáncer expresa SSEA4.
- 25 5. El CAR para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama humano, carcinoma de células renales (RCC) y cáncer de ovario humano.
- 30 6. Una población de células modificadas que expresan un CAR de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 35 7. La población de células modificadas de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dichas células modificadas son células T o células NK.
- 40 8. La población aislada de células modificadas de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7 para su uso en inmunoterapia.
9. Una composición farmacéutica que comprende células genéticamente modificadas que expresan un CAR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un portador farmacéuticamente aceptable.
10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que padece cáncer, en el que al menos una subpoblación de las células cancerosas de dicho cáncer expresa SSEA4.
11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 y un agente quimioterapéutico para uso combinado en el tratamiento de dicho cáncer.
12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 u 11 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 10-11, en la que dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama humano, carcinoma de células renales (RCC) humano y cáncer de ovario humano.
13. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el CAR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

Receptor de antígeno quimérico específico SSEEA4 (CAR)

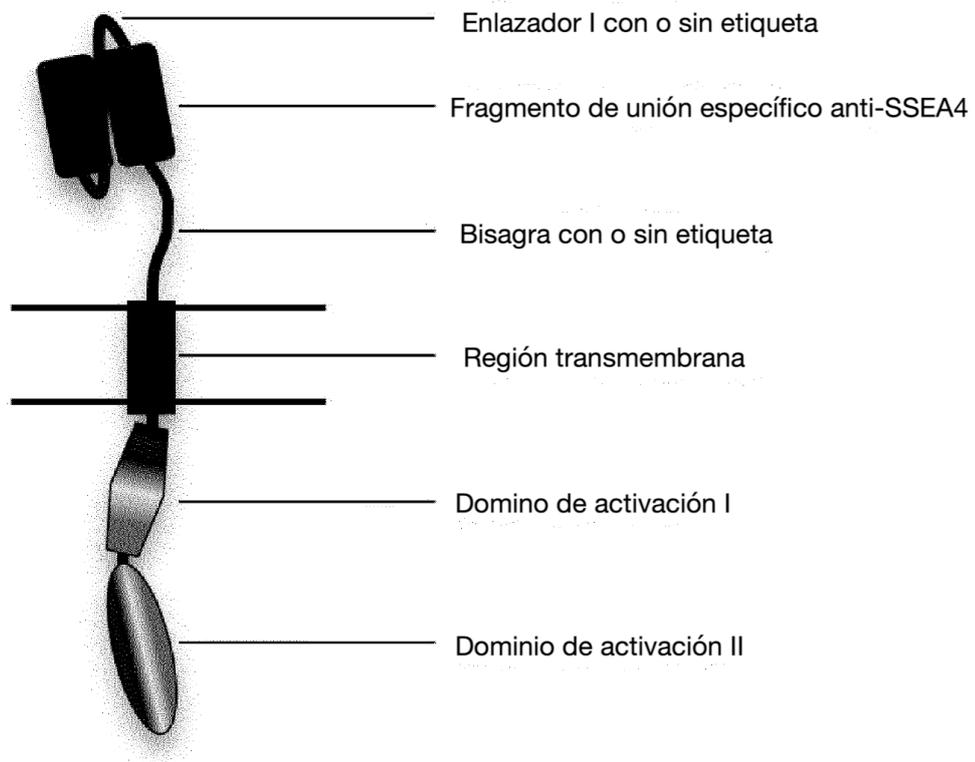


FIG 1

```

MDFQVQIIFSLIISAVIMSRQVQLKESGPGIVAPQSLSITCTVSGFSLSSQGVYVVRQPPGKGLWLGAIWAGGSTNNYSALMSRLSISKDNSKSQVFLKMNLSLQV
>>...Lkappa_Señal >>
_Péptido >>.....SSEA-4_VH.....>>
DDTAMYICARVDGYRGNMDYWGQGTSTVYSGGGGGGGGSENVLITQSPAIMSASPGKVTMTCSASSSVYMHWYQQKSTSPKLIWIYDTSKLIASGVPGRF
>.....SSEA-4_VH.....>>
>>.GS-Enlazador.>>
>>.....SSEA-4_VL.....>>
SGSGSGNSYSLTISMEAEADVATYYCFQSGGYPLTFGAGTKLELKAALPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEV
>.....SSEA-4_VL.....>>
>>>>
AAL-Enlazador
>>.....IgG_delta_(Bisagra).....>>
KENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
>.....IgG_delta_(Bisagra).....>>
ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITITLYCKRGRKKLLYIFKQPEM
>.....IgG_delta_(Bisagra).....>>
>>.....CD8alfa.....>>
>>...4-1BB.....>>
RPVQTTQEEEDGCSRFPPEEEEGGCELLRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNEINLGRREEYDVLDRRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSFI GMKGERR
>.....4-1BB.....>>
>>.....CD3_zeta.....>>
RGKGHDGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPR-
>.....CD3_zeta.....>>

```

FIG 2A

```

MDFQVQIFSFLLISASVIMSRENVLITQSPAIMSASPEKVTMTCSASSSVSMHWYQQSSITSPKLIWYDTSKLSASGVPRFSGSGGNSISLTISSMEAEADVATYYC
>>...Lkappa_Sefal.>>
_Péptido >>.....SSEA-4_VL.....SSEA-4_VL.....>>
FQGGYPLTFGAGTKLELKGGGGGGGGGGQVQLKESGPGLVAFPSQLSITCTVSGFSLSSQGVYWRQPPGKGLWLGAIWAGGSTNYSALMSRLSISKDNS
>>...SSEA-4_VL.....>>
>>.GS-Enlazador.>>
>>.....SSEA-4_VH.....SSEA-4_VH.....>>
KSQVFLKMNSLQTDDTAMYCYCARVDGYRGYNMIDYWGQGTSVTVSSAALPAEPKSPDKTHTCPFCPPAPPVAGPSVFLFPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEV
>>...SSEA-4_VH.....>>
>>>>
AAAL-Enlazador
>>.....IgG_delta_(Bisagra).....>>
KFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
>>.....IgG_delta_(Bisagra).....>>
ESNQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKIWIWAPLAGTCGVLLLSLVITITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM
>>.....IgG_delta_(Bisagra).....>>
>>.....CD8alfa.....>>
>>...4-1BB...>>
RPVQTQEEEDGCSRFPEEEGGCELLRVKFSRSADAPAYQQGQNLVNEINIGRREEYDVLDRRGRDFEMGGKPRKPNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERR
>>...4-1BB...>>
>>>>.....CD3_zeta.....>>
RGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR-
>>.....CD3_zeta.....>>

```

FIG 2B

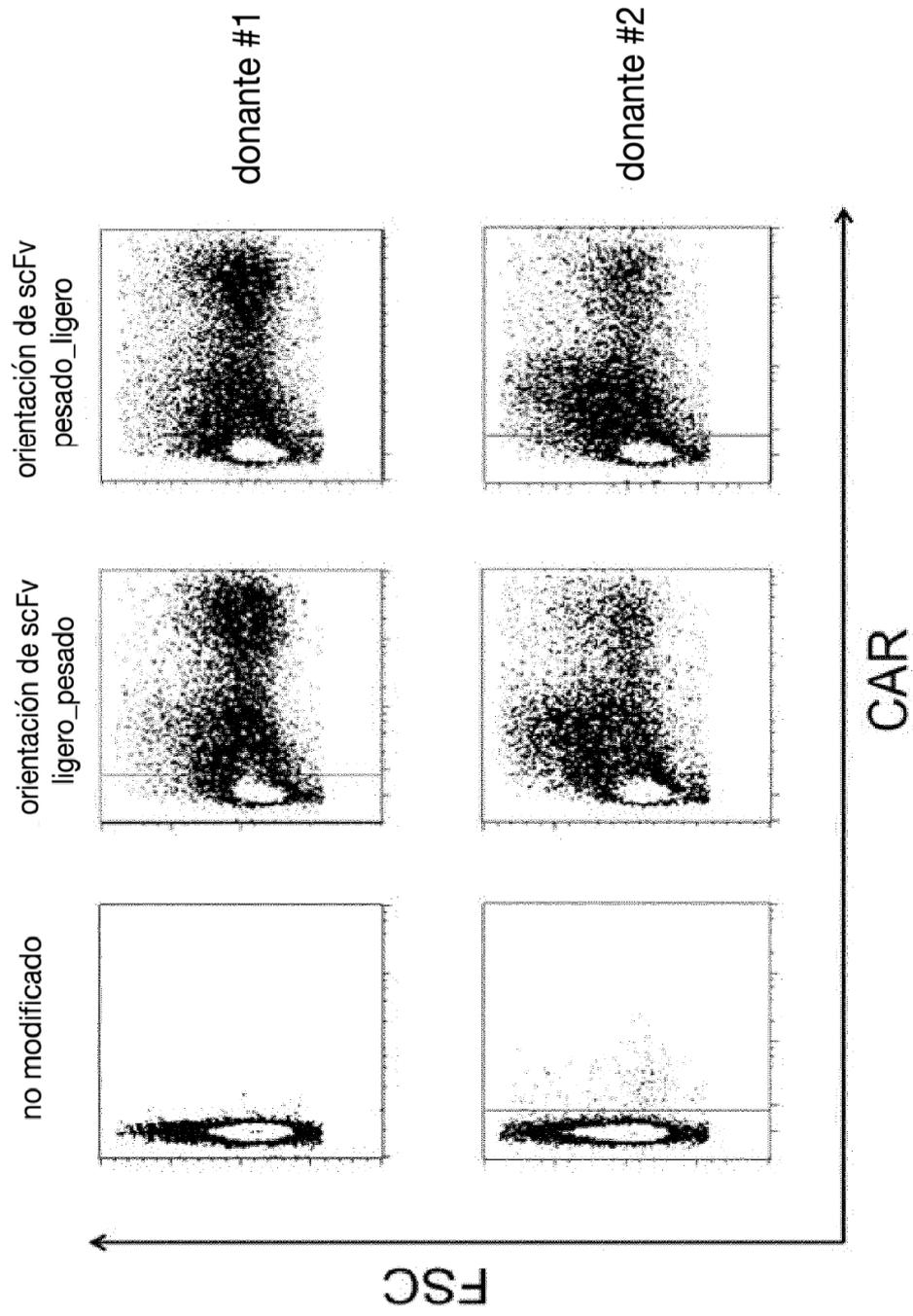


FIG 3

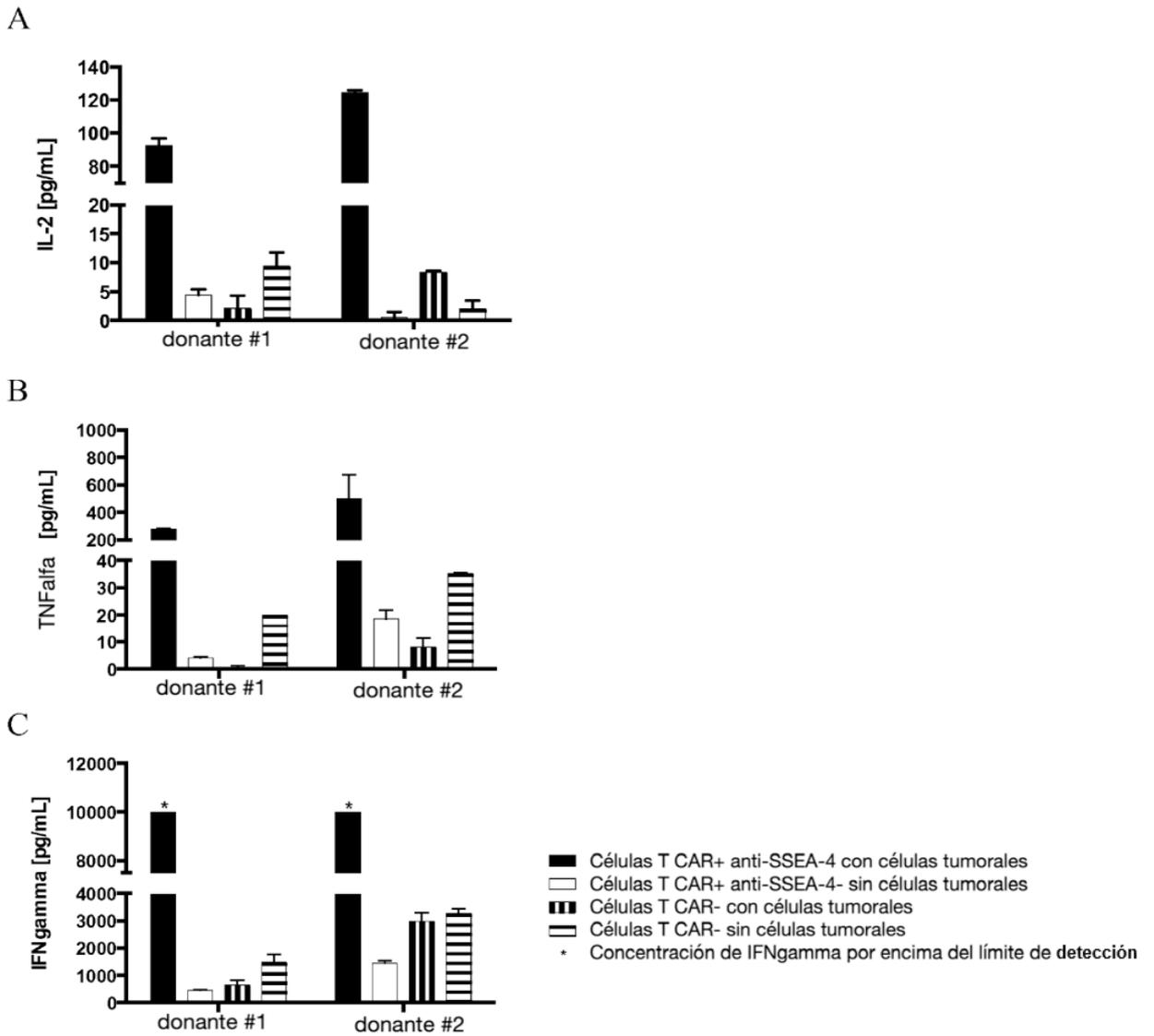
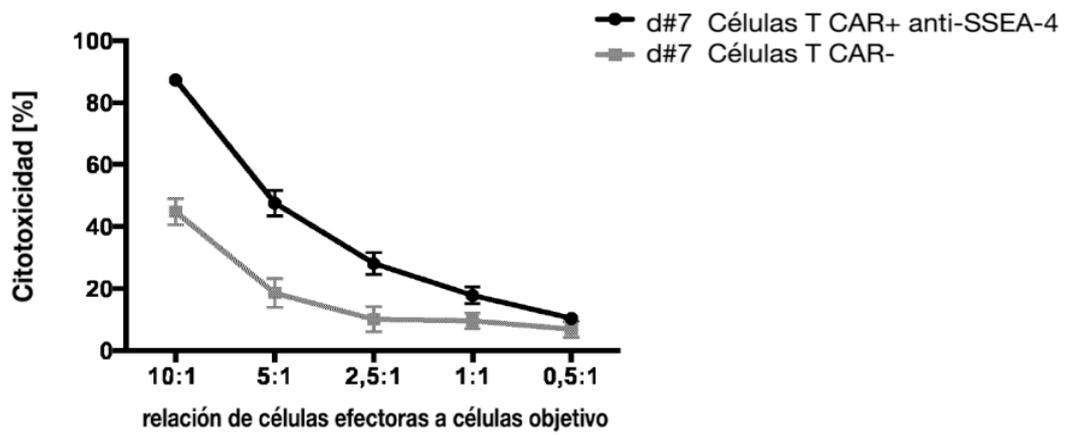


FIG 4

A



B

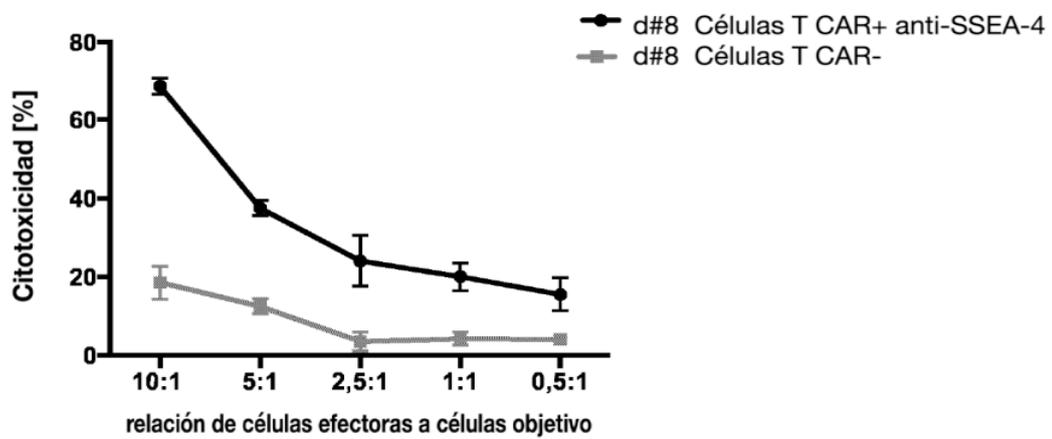


FIG 5