

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 423**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/028961**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2015 WO15105522**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14877876 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 3094653**

54 Título: **Receptores de antígenos quiméricos (CARs) con mutaciones en la región del espaciador Fc y métodos para su uso**

30 Prioridad:
13.01.2014 US 201461926881 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.06.2020

73 Titular/es:
**CITY OF HOPE (100.0%)
1500 East Duarte Road
Duarte, CA 91010, US**

72 Inventor/es:
**FORMAN, STEPHEN J.;
BROWN, CHRISTINE E.;
JONNALAGADDA, UMAMAHESWARARAO y
MARDIROS, ARMEN**

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 767 423 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

Receptores de antígenos quiméricos (CARS) con mutaciones en la región del espaciador Fc y métodos para su uso

DECLARACIÓN DE INTERÉS GUBERNAMENTAL

ANTECEDENTES

- 5 La inmunoterapia adoptiva que utiliza células T que expresan el receptor de antígeno quimérico (CAR, por sus siglas en inglés) es un tratamiento prometedor para el cáncer, porque estas células pueden reconocer y matar directamente las células tumorales que expresan antígeno de una manera independiente del antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés). Sin embargo, además de una cuidadosa elección del antígeno asociado al tumor diana, este enfoque terapéutico depende en gran medida del diseño molecular óptimo del CAR.
- 10 Aunque los CARs que contienen un scFv específico para TAA que produce una señal intracelular a través de un dominio coestimulador citoplasmático (p. ej., CD28 o 4-1BB) fusionado a CD3-zeta se ha demostrado en diversos sistemas que exhiben una potencia antitumoral significativa (Brentjens et al 2013; Brentjens et al. 2011; Grupp et al. 2013; Kalos et al. 2011; Kochenderfer et al. 2012), el rechazo inmunológico y el aclaramiento por parte del huésped sigue siendo un reto para el tratamiento eficaz del cáncer.
- 15 Determinadas modificaciones en el diseño del CAR han sido utilizadas para prevenir el aclaramiento mediado por FcR de células terapéuticas. Por ejemplo, se pueden utilizar secuencias de bisagra/espaciador que no se proceden de dominios Fc de Ig, tales como los de CD8α o CD28 (Brentjens et al. 2007; Kalos et al. 2011; Imai et al. 2004; Kochenderfer et al. 2009). Aunque estas secuencias del espaciador pueden aliviar la unión de FcR, su longitud puede no dotar a las células T con CAR de una potencia óptima cuando fijan como objetivo determinados antígenos.
- 20 Por ejemplo, cuando fijan como objetivo a 5T4, NCAM y MUC1 utilizando células T con CAR, se requerían regiones de enlazador más largas (es decir, más largas que las derivadas de CD8α o CD28) para una potencia óptima (Wilkie et al. 2008; Guest et al. 2005). Por lo tanto, sería deseable diseñar un CAR que aborde estos desafíos, al tiempo que mantenga su eficacia para matar las células cancerosas.
- 25 Jonnalagadda M, et al. describen en *Journal for Immunotherapy of Cancer*, vol. 1, nº Supl. 1, 7 de noviembre de 2013, en la página P18 que los CARs que incorporan mutaciones en la región del espaciador Fc de IgG4 eliminan el reconocimiento del receptor de Fc, lo que resulta en la persistencia mejorada de las células T con CAR y la eficacia antitumoral.
- Hudecek M. et al. describen en *Clinical Cancer Research*, vol. 19, nº 12, 25 de abril de 2013, en las páginas 3153-3164 que la afinidad del receptor y las modificaciones del dominio extracelular afectan el reconocimiento del tumor por las células T con receptor de antígeno quimérico específico para ROR1.
- 30

SUMARIO

La presente invención se define por las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes representan otras realizaciones de la invención.

- 35 La invención se refiere a un receptor de antígeno quimérico (CAR) recombinante, una población aislada de células inmunes humanas y una población aislada de células inmunes humanas transducidas con un gen CAR para uso en un método de tratamiento de un cáncer en un sujeto.

- 40 El receptor de antígeno quimérico (CAR) recombinante de la invención tiene una unión mermada a un receptor Fc (FcR, por sus siglas en inglés) y comprende: un dominio de reconocimiento de antígeno; un dominio de espaciador que comprende la secuencia de aminoácidos ESKYGPPCPPCPGGSSGGSGGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK; un dominio de transmembrana; un dominio de señalización intracelular, en donde el dominio de señalización intracelular es un dominio de señalización de cadena zeta del receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés); y uno o más dominios de señalización intracelular coestimuladores derivados de CD28, coestimuladores inducibles (ICOS, por sus siglas en inglés), OX40, CD27, DAP10, 4-1BB, p561ck o 2B4.
- 45

La población aislada de células inmunes humanas de la invención es transducida por un vector viral que comprende un casete de expresión que incluye un gen CAR, comprendiendo el gen una secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico (CAR) recombinante de la invención, en donde la población de células inmunes humanas expresa el gen CAR.

- 50 De acuerdo con la invención, la población aislada de células inmunes humanas transducidas con un gen CAR para uso en un método de tratamiento de un cáncer en un sujeto comprende un gen CAR, en donde el gen CAR

comprende una secuencia de nucleótidos que codifica: un dominio de reconocimiento de antígeno que se dirige a un antígeno asociado al cáncer específico para el cáncer; un dominio de espaciador que comprende la secuencia de aminoácidos

5 ESKYGPPCPPCGGGSSGGGSGGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSGDGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK; un dominio de señalización intracelular, en donde el dominio de señalización intracelular es un dominio de señalización de cadena zeta del receptor de células T (TCR); y uno o más dominios de señalización intracelular coestimuladores derivados de CD28, coestimuladores inducibles (ICOS), OX40, CD27, DAP10, 4-1BB, p561ck o 2B4.

10 De acuerdo con algunas realizaciones, se proporcionan receptores de antígeno quimérico (CAR) recombinantes que tienen una unión mermada a un receptor Fc (FcR). Dichos CARs pueden incluir, pero no se limitan a un dominio de reconocimiento de antígeno, un dominio de espaciador derivado de una región Fc de inmunoglobulina modificada que tiene una o más mutaciones en su región CH2 que da como resultado una unión mermada a un FcR, y un dominio de señalización intracelular.

15 En otra realización, se proporciona una población de células inmunes humanas transducidas por un vector viral que comprende un casete de expresión que incluye un gen CAR. En algunos aspectos, el gen CAR comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de reconocimiento de antígeno, un dominio de espaciador derivado de una región Fc de inmunoglobulina modificada que tiene una o más mutaciones en su región CH2 que dan como resultado una unión mermada a un FcR, y un dominio de señalización intracelular, en donde la población de células inmunes humanas expresa el gen CAR.

20 En otra realización, se proporciona una población aislada de células inmunes humanas transducidas con un gen CAR para uso en un método de tratar un cáncer en un sujeto. Un método de este tipo incluye administrar una población de células inmunes humanas transducidas con un gen CAR al sujeto. En algunos aspectos, el gen CAR comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de reconocimiento de antígeno que fija como objetivo un antígeno asociado al cáncer específico para el cáncer, un dominio de espaciador derivado de una región Fc de inmunoglobulina modificada que tiene una o más mutaciones en su región CH2, dando como resultado una unión mermada a un FcR y un dominio de señalización intracelular.

25 El diseño de un CAR que tiene un dominio de espaciador que tiene una unión disminuida o mermada a FcRs (tales como los descritos en esta memoria) ayuda a prevenir que las células que expresan el FcR reconozcan y destruyan, o activen de forma no intencionada las células inmunoterapéuticas que expresan el CAR *in vivo*. Por lo tanto, estos CARs ayudan a prevenir el rechazo inmunológico y el aclaramiento de las células destinadas a proporcionar un beneficio terapéutico a los pacientes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 La FIG. 1 muestra que células T que expresan CAR, específicas para CD19, no se injertan eficazmente en ratones NSG de acuerdo con una realización. La FIG. 1a muestra los esquemas de las construcciones de expresión CD19R/EGFRt (parte superior) y EGFRt (parte inferior) que se utilizaron para modificar las células T genéticas para estudios de injerto. Se indican porciones de secuencia del CAR coestimulador de CD28 y específico para CD19 (CD19R), el T2A auto-escindible, el huEGFRt y los genes DHFR^{FS} e IMPDH2^{IY} de resistencia a fármacos, junto con las secuencias promotoras del Factor de Alargamiento 1 (EF-1p), las secuencias de señal de la cadena alfa del receptor GM-CSF (GMCSFRss) y los 3 codones de parada de nucleótidos. La FIG. 1b es un análisis de citometría de flujo de células T administradas a ratones NSG para estudios de injerto. Células derivadas de T_{CM} se dejaron sin transducidas (Non-Txd), o se transdujeron con vectores lentivirales que contienen las construcciones CD19R/EGFRt (CD19R) o EGFRt/DHFRFS/IMPDH2IY (EGFRt) descritas en (A) e inmunomagnéticamente seleccionadas para la expresión de EGFRt. Las células se expandieron después *in vitro* durante 19 días y se analizaron para determinar el fenotipo superficial. Los porcentajes de tinción de células con anticuerpos específicos para CD4 (parte superior) o CD8 (parte inferior) frente a EGFRt se indican en cada uno de los histogramas, utilizando cuadrantes que se crearon en base a la tinción de control negativo. En la FIG. 1c, se administraron i.v. 10⁷ células derivadas de T_{CM} tal como se describe en (B) a ratones NSG con soporte de NS0-IL15 irradiado. Los leucocitos de sangre periférica de los días 7 y 14 que se recogieron de cada uno de los grupos (n = 3-5 ratones) se tiñeron utilizando CD45 anti-humano conjugado con FITC y cetuximab biotinilado, seguido de estreptavidina conjugada con PE. En cada uno de los histogramas se indican los porcentajes de células huCD45+ y huCD45+EGFRt+, ligadas a linfocitos, utilizando cuadrantes que se crearon en base a la tinción de control negativo. Los datos son representativos de 4 experimentos diferentes realizados con células derivadas de T_{CM} de múltiples donantes.

55 La FIG. 2 ilustra que células T que expresan CAR, específicas para CD19, se unen a FcγR1 soluble de acuerdo con una realización. Las mismas células T descritas en la FIG. 1 se tiñeron con la titulación en volumen indicada del receptor gamma Fc humano soluble biotinilado 1 seguido de estreptavidina conjugada con PE (SA-PE, histograma

gris). Para las células que expresan CD19R, los porcentajes de células inmunorreactivas se indican en cada uno de los histogramas y se basan en un conjunto de barreras M1 para detectar $\leq 1\%$ de las manchadas con SA-PE solo (línea negra).

5 La FIG. 3 muestra que un espaciador de IgG4 mutado no afecta la función del efector específica para CD19 de células T que expresan CAR de acuerdo con una realización. La FIG. 3a muestra los esquemas del CAR específico para CD19 parental (CD19R), el CAR específico para CD19 que contiene las mutaciones de 2 puntos, L235E y N297Q, en la porción CH2 del espaciador de IgG4 (CD19R(EQ)), y el CAR específico para CD19 que contiene un espaciador de IgG4 truncado, en donde se separa todo el dominio CH2 (CD19Rch2 Δ). También se representan el dominio scFv de unión a ligando derivado del mAb FMC63, los dominios de señalización de transmembrana y citoplasmático derivados de huCD28 y el dominio de señalización citoplasmático de huCD3 ζ . En la FIG. 3b, células derivadas de T_{CM}, enriquecidas con EGFRt y expandidas que expresan el CD19R parental, el marcador EGFRt solo, el CD19R que tiene una mutación puntual IgG4 sola en el aminoácido 235 (CD19R(L235E)) o el aminoácido 297 (CD19R(N297Q)), se analizó la expresión transgénica de CD19R(EQ) con doble mutación o de CD19Rch2 Δ con CH2 eliminado. Los porcentajes de las células que se tiñen con anticuerpos específicos para el CAR que contiene Fc (parte superior) o EGFRt (parte inferior) se indican en cada uno de los histogramas, y se basan en un conjunto de barreras M1 para detectar $\leq 1\%$ del teñido con SA-PE solo (línea negra). En la Fig. 3c, las mismas células utilizadas en la FIG. 3b se utilizaron como efectores en un ensayo de liberación de cromo de 4 horas frente a dianas CD19⁺ LCL o SupB15 marcados con ⁵¹Cr. LCL que expresa el agonista OKT3 de CD3 (LCL-OKT3) y células K562 negativas para CD19 se utilizaron como dianas de control positivo y negativo, respectivamente. Se muestra el porcentaje medio de liberación de cromo \pm D.E. de pocillos por triplicado en las relaciones E:T indicadas.

La FIG. 4 muestra que CARs con un espaciador de IgG4 mutado exhiben una unión de Fc γ R inhibida de acuerdo con una realización. Líneas celulares expandidas derivadas de TCM, enriquecidas con EGFRt que expresan el marcador EGFRt solo, el CD19R parental, el CD19R(L235E) mutado en un solo punto o el CD19R(N297Q), el CD19R(EQ) mutado en dos puntos, o el CD19Rch2 Δ CH2 eliminado se tiñeron con los siguientes reactivos biotinilados: anticuerpo anti-Fc (para detectar el CAR), cetuximab (para detectar EGFRt) o los receptores Fc solubles humanos (Hu) o murinos (Mu) indicados (Fc γ R1, R2a o R2b); seguido de estreptavidina conjugada con PE (SA-PE, histograma gris). Los porcentajes de células inmunorreactivas se indican en cada uno de los histogramas y se basan en un conjunto de barreras M1 para detectar $\leq 1\%$ de las manchadas con SA-PE solo (línea negra).

La FIG. 5 muestra que las células T que expresan CARs con espaciador de IgG4 mutado exhiben un injerto potenciado *in vivo* de acuerdo con una realización. 10⁷ células enriquecidas con EGFRt, derivadas de T_{CM}, que expresan el CD19R parental, el marcador EGFRt solo, el CD19R(L235E) mutado en un solo punto o el CD19R(N297Q), el CD19R(EQ) mutado en dos puntos o el CD19Rch2 Δ CH2 eliminado (véase el fenotipo FIG. 3b) se infundieron i.v. en ratones NSG el día 0 con soporte NS0-IL15 irradiado. Leucocitos de la sangre periférica de los Días 7 y 14 recogidos de cada uno de los grupos (n = 5 ratones) se tiñeron utilizando CD45 anti-humano conjugado con PerCP y cetuximab biotinilado, seguido de estreptavidina conjugada con PE. En la FIG. 5a se indican porcentajes medios de células CD45⁺ EGFRt⁺ en la población ligada a linfocitos viable \pm E.M.T. *, p < 0,034 en comparación con los ratones que recibieron células que expresan CD19R utilizando un test t de Student no apareado. La FIG. 5b muestra histogramas representativos (es decir, mediana 3 de cada uno de los grupos de 5 ratones) que se representan con cuadrantes creados en base a la tinción de control. Los porcentajes de células huCD45⁺ EGFRt⁺ se indican en cada uno de los histogramas.

La FIG. 6 muestra que células derivadas de T_{CM} que expresan CARs con espaciador de IgG4 mutado exhiben una eficacia terapéutica potenciada de acuerdo con algunas realizaciones. Se administraron i.v. 1,5 x 10⁶ células LCL fLuc⁺ a ratones NSG el día 0, y luego 5 x 10⁶ células CAR⁺ derivadas de T_{CM} (10⁷ células en total) que expresaban el marcador EGFRt solo, el CD19R parental, el CD19R(EQ) mutado en dos puntos o el CD19Rch2 Δ CH2 eliminado se infundieron i.v. en ratones NSG el día 3. El crecimiento del tumor LCL se monitorizó luego mediante formación de imágenes de Xenogen. La FIG. 6a muestra un análisis de citometría de flujo que representa los perfiles de CAR de las células derivadas de T_{CM} de entrada (utilizadas el día 23 después de la estimulación de perlas y la lenti-transducción). Los porcentajes de células inmunorreactivas se indican en cada uno de los histogramas y se basan en un conjunto de barreras M1 para detectar $\leq 1\%$ de las manchadas con SA-PE solo (línea negra). La FIG. 6b muestra los niveles medios de flujo (\pm E.M.T.) de la actividad de luciferasa representados para cada uno de los grupos (n = 6). La FIG. 6c muestra imágenes representativas de bioluminiscencia de ratones NSG el día 21 para cada uno de los grupos. La FIG. 6d muestra porcentajes medios (+ E.M.T.) de células CD45⁺ EGFRt⁺ en la población ligada a linfocitos viable de sangre periférica el día 21. *, p < 0,035 en comparación con ratones que recibieron células que expresan CD19R utilizando un ensayo t de Student no apareado. La FIG. 6e muestra un análisis de supervivencia de Kaplan Meier para cada uno de los grupos. Las pruebas de log-rank (Mantel-COX) se utilizaron para realizar análisis estadísticos de supervivencia entre grupos; *, p = 0,0009 en comparación con ratones que recibieron células T que expresan el CD19R parental.

La FIG. 7 muestra que las células T a granel que expresan CD19R(EQ) exhiben una eficacia terapéutica mejorada de acuerdo con una realización. Se administraron i.v. $1,5 \times 10^6$ células LCL flLuc⁺ a ratones NSG el día 0, y luego se infundieron i.v. 5×10^6 células CAR⁺ T que expresaban el CD19R parental o el CD19R(EQ) mutado en dos puntos a ratones NSG el día 2. El crecimiento del tumor de LCL se monitorizó luego mediante formación de imágenes de Xenogen. La FIG. 7a muestra un análisis de citometría de flujo de los perfiles CAR (parte superior), EGFRt frente a CD3 (centro) y CD4 frente a CD8 (parte inferior) de las células T de entrada (utilizado el día 21 después de la estimulación con perlas y lentitransducción). Los porcentajes de células inmunorreactivas según se determina por la sustracción del histograma (parte superior), o en base a los cuadrantes que se dibujaron de acuerdo con la tinción de las células transducidas simuladas y la tinción de control de isotipo (centro, parte inferior) se representan en cada uno de los histogramas. La FIG. 7b muestra imágenes representativas de bioluminiscencia de ratones NSG los días 2, 11 y 23 para cada uno de los grupos. La FIG. 7c muestra los niveles medios de flujo (\pm E.M.) de la actividad luciferasa se representan para cada uno de los grupos (n = 3). La FIG. 7d muestra un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para cada uno de los grupos. Las pruebas de log-rank (Mantel-COX) se utilizaron para realizar análisis estadísticos de supervivencia entre grupos; *, p = 0,0295 en comparación con ratones que recibieron células T que expresan el CD19R parental.

La FIG. 8 muestra que células derivadas de T_{CM} no enriquecidas, que expresan CARs con espaciador de IgG4 mutado exhiben un injerto potenciado *in vivo de acuerdo con algunas realizaciones*. 10^7 células derivadas de T_{CM} que expresan el marcador EGFRt solo, el CD19R parental o el CD19R(EQ) mutado en dos puntos se infundieron i.v. en ratones NSG el día 0 con soporte de NS0-IL15 irradiado. Leucocitos de la sangre periférica los días 7 y 14 recogidos de cada uno de los grupos (n = 4-6 ratones) se tiñeron utilizando CD45 anti-humano conjugado con PerCP y cetuximab biotinilado seguido de estreptavidina conjugada con PE. La FIG. 8A muestra un análisis de citometría de flujo que representa los perfiles CAR de células derivadas de T_{CM} de entrada (utilizadas el día 26 después de la estimulación con perlas y la lentitransducción). Los porcentajes de las células que se tiñen con anticuerpos específicos para el CAR que contiene Fc (parte superior) o EGFRt (parte inferior) se indican en cada uno de los histogramas y se basan en un conjunto de barreras M1 para detectar el 1% de las manchadas con SA-PE solo (línea negra). La FIG. 8B muestra porcentajes medios de células CD45+EGFRt⁺ en la población ligada a linfocitos viable \pm E.M.T. *, p = 0,004 y **, p = 0,057 cuando se utiliza un ensayo t de Student no apareado para comparar ratones infundidos con células derivadas de T_{CM} que expresan el CD19R parental frente a CD19R(EQ). La FIG. 8C muestra histogramas representativos (es decir, la mediana 2 de cada uno de los grupos de 4-6 ratones) se representan con cuadrantes creados en base a la tinción de control. Los porcentajes de células huCD45+ EGFRt⁺ se indican en cada uno de los histogramas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los siguientes Ejemplos están destinados a ilustrar diversas realizaciones de la invención. Como tal, las realizaciones específicas discutidas no deben interpretarse como limitaciones en el alcance de la invención.

35 Receptores de antígenos quiméricos

De acuerdo con las realizaciones descritas en esta memoria, se proporcionan receptores de antígenos quiméricos (CARs) recombinantes para fijar como objetivo antígenos relacionados con el cáncer y métodos para su uso. Tal como se describe en las realizaciones que figuran más adelante, un CAR puede incluir una serie de dominios de proteínas o péptidos que incluyen, pero no se limitan a uno o más de un dominio de unión a antígeno, un dominio de espaciador, un dominio de transmembrana, un dominio de señalización intracelular y un dominio coestimulador intracelular.

En algunas realizaciones, se proporciona un gen que codifica el CAR, en donde el gen incluye una secuencia de nucleótidos o ácidos nucleicos que incluye una serie de regiones que codifican una secuencia de aminoácidos correspondiente a los dominios de proteína o péptido del CAR descritos en esta memoria. Debido a que se conoce la degeneración del código genético, cualquier secuencia de aminoácidos descrita en esta memoria también es indicativa de todos los codones de ácidos nucleicos degenerados correspondientes a cada uno de los aminoácidos en dichas secuencias. Como tal, se entiende que las realizaciones que describen CARs y sus dominios pueden proporcionarse como un gen que comprende una secuencia de ácido nucleico, así como las secuencias de aminoácidos codificadas por dichos genes.

50 En una realización, un CAR puede incluir, pero no se limita a un dominio de unión al antígeno, un dominio de espaciador, opcionalmente al menos un dominio de señalización intracelular y, opcionalmente, al menos un dominio coestimulador intracelular.

En otras realizaciones, un CAR puede incluir, pero no se limita a un dominio de unión al antígeno, un dominio de espaciador y al menos un dominio de señalización intracelular.

En otras realizaciones, un CAR puede incluir, pero no se limita a un dominio de unión al antígeno, un dominio de espaciador, al menos un dominio de señalización intracelular y al menos un dominio coestimulador intracelular.

Dominio de unión al antígeno

5 Un dominio de unión al antígeno de CAR puede incluir una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa como un péptido o polipéptido, se une a un epítipo de un antígeno relacionado con el cáncer. En algunas realizaciones, un antígeno relacionado con el cáncer puede ser cualquier antígeno expresado por o sobre-expresado por una célula cancerosa (p. ej., una célula tumoral, una célula neoplásica, una célula maligna o cualquier otra célula cancerosa), y puede ser una proteína, un péptido, hidrato de carbono, glucoproteína, gangliósido, proteoglicano o cualquier combinación o complejo de los mismos. En algunos aspectos, el antígeno relacionado con el cáncer es un antígeno específico para el tumor (TSA) que puede expresarse solo en células cancerosas o tumorales, mientras que en otros aspectos, el antígeno relacionado con el cáncer es un antígeno asociado al tumor (TAA) que puede ser expresado tanto en células tumorales como en células normales. En otros aspectos, el antígeno relacionado con el cáncer puede ser un producto de un oncogén mutado o un gen supresor de tumores, o un producto de otro gen mutado (p. ej., proteínas celulares sobre-expresadas o expresadas de forma aberrante, antígenos tumorales producidos por virus oncogénicos, antígenos oncofetales, glucolípidos o glucoproteínas alterados de la superficie celular, o antígenos de diferenciación específicos para el tipo de célula).

De acuerdo con las realizaciones descritas en esta memoria, los antígenos relacionados con el cáncer que pueden ser fijados como objetivo por un dominio de unión a antígeno de CAR descritos en esta memoria incluyen, pero no se limitan a 5T4, 8H9, integrina $\alpha_v\beta_6$, alfa-fetoproteína (AFP), B7-H6, CA-125, anhidrasa carbónica 9 (CA9), CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD52, CD123, CD171, antígeno carcinoembrionario (CEA), EGFRvIII, glucoproteína-2 epitelial (EGP-2), glucoproteína-40 epitelial (EGP-40), ErbB1/EGFR, ErbB2/HER2/neu/EGFR2, ErbB3, ErbB4, antígeno tumoral epitelial (ETA), FBP, receptor de acetilcolina fetal (AChR), receptor de folato α , G250/CAIX, gangliósido 2 (GD2), gangliósido 3 (GD3), HLA-A1, HLA-A2, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), receptor de IL-13 $\alpha 2$, KDR, cadena ligera k, Lewis Y (LeY), molécula de adhesión celular L1, antígeno asociado a melanoma (MAGE-A1), mesotelina, células infectadas con CMV murino, mucina-1 (MUC1), mucina-16 (MUC16), ligandos del miembro D del grupo asesino natural 2 (NKG2D), molécula de adhesión de células nerviosas (NCAM), NY-ESO-1, antígeno oncofetal (h5T4), antígeno de células madre prostáticas (PSCA), antígeno de membrana específico para la próstata (PSMA), receptor huérfano 1 similar al receptor de tirosina quinasa (ROR1), TAA fijado como objetivo por el mAb IgE, glucoproteína 72 asociada al tumor (TAG-72), tirosinasa y receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno que forma parte de un CAR descrito en esta memoria fija como objetivo CD19 o CD123.

Un dominio de unión a antígeno puede ser cualquier resto de fijación de objetivo que fija como objetivo un antígeno asociado con el cáncer. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno es un anticuerpo o fragmento funcional de un anticuerpo. Un anticuerpo se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a, o que es inmunológicamente reactiva con un antígeno o epítipo, e incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de anticuerpo funcionales, que incluyen, pero no se limitan a fragmentos de unión a antígeno (Fab), fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fv, fragmentos de IgG recombinante (rlgG), fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) y fragmentos de anticuerpos de dominio único (p. ej., fragmentos sdAb , sdFv, nanocuerpo). La expresión "anticuerpo o fragmento funcional del mismo" también incluye formas de inmunoglobulinas modificadas genéticamente o modificadas de otro modo, tales como intracuerpos, pepticuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos completamente humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos heteroconjugados (p. ej., anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, di-scFv en tándem, tri-scFv en tándem). A menos que se indique lo contrario, el término "anticuerpo" debe entenderse que abarca fragmentos de anticuerpos funcionales del mismo. En una realización, el dominio de unión a antígeno es un scFv que tiene una cadena pesada (V_H) y una ligera (V_L). En otras realizaciones, el dominio de unión a antígeno es un scFv que fija como objetivo CD19 o CD123. En tales realizaciones, el scFv que fija como objetivo CD19 puede tener la siguiente secuencia de aminoácidos:

```

CD19R VL      DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS KYLNWYQQKP
                DGTVKLLIYH TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ
                EDIATYFCQQ GNTLPYTFGG GTKLEIT (SEQ ID NO:1)
CD19R VH      EVKLQESGPG LVAPSQSLSV TCTVSGVSLP DYGVSWIRQP
                PRKGLEWLGV IWGSETTYYN SALKSRLTII KDNSKSVFL
                KMNSLQTD DDT AIYYCAKHYY YGGSYAMDYW GQGTSVTVSS
                (SEQ ID NO:2)
    
```

Y el scFv que fija como objetivo CD123 puede tener una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

CD123 V_{H1} QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYIFT NYGMNWKQA
 PGKSFKWMGW INTYTGESTY SADFKGRFAF SLETSASTAY
 LHINDLKNE TATYFCARSG GYDPMDYWGQ GTSVTVSS
 (SEQ ID NO:3)

CD123 V_{H2} QVQLQQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWKQR
 PDQGLEWIGR IDPYDSETHY NQKFKDKAIL TVDKSSSTAY
 MQLSSLTSED SAVYYCARGN WDDYWGQGT LTVSS
 (SEQ ID NO:4)

CD123 V_{L1} DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD NYGNTFMHWY

QQKPGQPPKL LIYRASNL E GIPARFSGSG SRTDFTLTIN
 PVEADDVATY YCQQSNEDPP TFGAGTKLEL K (SEQ ID

NO:5)

CD123 V_{L2} DVQITQSPSY LAASPGETIT INCRASKSIS KDLAWYQEKP
 GKTNKLIIYS GSTLQSGIPS RFSGSGSGTD FTLTISSELP
 EDFAMYYCQQ HNKYPYTFGG GTKLEIK (SEQ ID NO:6)

Dominio de espaciador

El dominio de espaciador del CAR de la invención comprende la secuencia de aminoácidos

ESKYGPPCPPCGGGSSGGSGGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG

FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS

VMHEALHNHYTQKLSLSLGK.

5 La divulgación describe más dominios de espaciador. Un dominio de espaciador (al que también se alude como "región bisagra" o "región espaciador/bisagra") puede derivarse de o incluir al menos una porción de una región Fc de inmunoglobulina, por ejemplo, una región Fc de IgG1, una región Fc de IgG2, una región Fc de IgG3, una región Fc de IgG4, una región Fc de IgE, una región Fc de IgM o una región Fc de IgA. En determinadas realizaciones, el dominio de espaciador incluye al menos una porción de una región Fc de inmunoglobulina IgG1, una IgG2, una IgG3, una IgG4, una IgE, una IgM o una IgA que cae dentro de sus dominios CH2 y CH3. En algunas realizaciones, el dominio de espaciador también puede incluir al menos una porción de una región de bisagra de inmunoglobulina correspondiente. En algunas realizaciones, el dominio de espaciador se deriva de o incluye al menos una porción de una región Fc de inmunoglobulina modificada, por ejemplo, una región Fc de IgG1 modificada, una región Fc de IgG2 modificada, una región Fc de IgG3 modificada, una región Fc de IgG4 modificada, una región Fc de IgE modificada, una región Fc de IgM modificada o una región Fc de IgA modificada. La región Fc de inmunoglobulina modificada puede tener una o más mutaciones (p. ej., mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, duplicaciones) que dan como resultado una o más sustituciones, modificaciones o deleciones de aminoácidos que provocan una unión deteriorada del dominio de espaciador a un receptor Fc (FcR). En algunos aspectos, la región Fc de inmunoglobulina modificada puede diseñarse con una o más mutaciones que dan como resultado una o más sustituciones, modificaciones o deleciones de aminoácidos que provocan una unión deteriorada del dominio espaciador a uno o más FcR, incluyendo, pero no limitados a FcγRI, FcγR2A, FcγR2B1, FcγR2B2, FcγR3A, FcγR3B, FcεRI, FcεR2, FcαRI, FcαμR o FcRn.

25 Algunas secuencias de aminoácidos dentro del dominio Fc CH2 han sido identificadas como que tienen implicación en la interacción con el anticuerpo FcR (Strohl, 2009). FcRs, tales como FcγRI, son proteínas integrales de la membrana ubicadas en las células inmunes, incluidas las células asesinas naturales (NK) y los macrófagos, que luego utilizan esta capacidad de fijación de objetivo de Fc para llevar a cabo diversas funciones inmunes, tales como la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y la fagocitosis.

30 El deterioro de la unión a FcRs por el dominio de espaciador previene que células que expresan el FcR reconozcan y destruyan o activen de forma no intencionada las células inmunoterapéuticas que expresan el CAR *in vivo*, ayudando con ello a prevenir el rechazo inmunológico y el aclaramiento de las células destinadas a proporcionar un beneficio terapéutico a los pacientes. Las mutaciones descritas en esta memoria también contribuyen a reducir los efectos fuera de objetivo del CAR y, con ello, a aumentar su especificidad y eficacia.

Una "modificación de aminoácidos" o una "sustitución de aminoácidos" o una "sustitución", tal como se utiliza en esta memoria, significa una sustitución, inserción y/o delección de aminoácidos en una secuencia de proteína o péptido. Una "sustitución de aminoácidos" o "sustitución", tal como se utiliza en esta memoria, significa un reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de péptido o proteína precursora con otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución S228P se refiere a una proteína o péptido variante, en la que la serina en la posición 228 está reemplazada por prolina.

Las sustituciones de aminoácidos se pueden realizar mediante una mutación, de modo que un codón particular en la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína o el péptido se cambia a un codón que codifica un aminoácido diferente. Una mutación de este tipo se realiza generalmente haciendo la menor cantidad posible de cambios de nucleótidos. Se puede hacer una mutación de sustitución de este tipo para cambiar un aminoácido en la proteína resultante de una manera no conservadora (es decir, cambiando el codón de un aminoácido que pertenece a una agrupación de aminoácidos que tiene un tamaño o característica particular a un aminoácido que pertenece a otra agrupación) o de manera conservadora (es decir, cambiando el codón de un aminoácido que pertenece a una agrupación de aminoácidos que tiene un tamaño o característica particular a un aminoácido que pertenece a la misma agrupación). Un cambio conservador de este tipo conduce generalmente a un cambio menor en la estructura y función de la proteína resultante.

Lo que sigue son ejemplos de diversas agrupaciones de aminoácidos:

Aminoácidos con grupos R no polares: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina.

Aminoácidos con grupos R polares no cargados: glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina.

Aminoácidos con grupos R polares cargados (cargados negativamente a pH 6,0): ácido aspártico, ácido glutámico.

Aminoácidos de carácter básico (cargados positivamente a pH 6,0): lisina, arginina, histidina (a pH 6,0).

Otra agrupación puede ser aquellos aminoácidos con grupos fenilo: fenilalanina, triptófano, tirosina.

Otra agrupación puede ser de acuerdo con el peso molecular (es decir, tamaño de los grupos R) tal como se muestra a continuación:

Glicina	75
Alanina	89
Serina	105
Prolina	115
Valina	117
Treonina	119
Cisteína	121
Leucina	131
Isoleucina	131
Asparagina	132
Ácido aspártico	133
Glutamina	146
Lisina	146
Ácido glutámico	147
Metionina	149
Histidina (a pH 6,0)	155
Fenilalanina	165
Arginina	174
Tirosina	181
Triptófano	204

En determinadas realizaciones, el dominio de espaciador se deriva de una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 modificada que incluye uno o más residuos de aminoácidos sustituidos con un residuo de aminoácido diferente del presente en una bisagra sin modificar. El uno o más residuos de aminoácidos sustituidos se seleccionan entre, pero no se limitan a uno o más residuos de aminoácidos en las posiciones 220, 226, 228, 229, 230, 233, 234, 235, 234, 237, 238, 239, 243, 247, 267, 268, 280, 290, 292, 297, 298, 299, 300, 305, 309, 218, 326, 330, 331, 332, 333, 334, 336, 339, o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el dominio de espaciador se deriva de una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 modificada que incluye, pero no se limita a uno o más de las siguientes sustituciones de residuos de aminoácidos: C220S, C226S, S228P, C229S, P230S, E233P, V234A, L234V, L234F, L234A, L235A, L235E, G236A, G237A, P238S, S239D, F243L, P247I, S267E, H268Q, S280H, K290S, K290E, K290N, R292P, N297A, N297Q, S298A, S298G, S298D, S298V, T299A, Y300L, V305I, V309L, E318A, K326A, K326W, K326E, L328F, A330L, A330S, A331S, P331S, I332E, E333A, E333S, E333S, K334A, A339D, A339Q, P396L, o una combinación de las mismas.

5

En algunas realizaciones, el dominio de espaciador se deriva de una región Fc de IgG que tiene una o más modificaciones hechas a su región CH2-CH3, en donde la región CH2-CH3 de IgG no modificada corresponde a una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

IgG1	APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD	GVEVHNAKTK
IgG2	APP-VAGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVQFNWYVD	GVEVHNAKTK
IgG3	APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVQFKWYVD	GVEVHNAKTK
IgG4	APEFLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSQED	PEVQFNWYVD	GVEVHNAKTK
IgG1	PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	PIEKTISKAK	GQPREPQVYT
IgG2	PREEQFNSTF	RVVSVLTVVH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPA	PIEKTISKTK	GQPREPQVYT
IgG3	PREEQYNSTF	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	PIEKTISKTK	GQPREPQVYT
IgG4	PREEQFNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPS	SIEKTISKAK	GQPREPQVYT
IgG1	LPPSRISKAK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTPPVLDL	DGSFFLYSKL
IgG2	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDISVE	WESNGQPENN	YKTPPMLDK	DGSFFLYSKL
IgG3	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESSGQPENN	YNTTPPMLDS	DGSFFLYSKL
IgG4	LPPSQEEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTPPVLDL	DGSFFLYSRL
IgG1	TVDKSRWQQG	NVFSQSVMHE	ALHNHYTQKS	LSSLSPGK (SEQ ID NO:7)		
IgG2	TVDKSRWQQG	NVFSQSVMHE	ALHNHYTQKS	LSSLSPGK (SEQ ID NO:8)		
IgG3	TVDKSRWQQG	NIFSCSVMHE	ALHNRFTQKS	LSSLSPGK (SEQ ID NO:9)		
IgG4	TVDKSRWQEG	NVFSQSVMHE	ALHNHYTQKS	LSSLSLGK (SEQ ID NO:10)		

10

En algunas realizaciones, el dominio de espaciador se deriva de una región Fc de IgG que tiene una o más modificaciones hechas en su región de bisagra, en donde la región de bisagra de IgG no modificada corresponde a una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

IgG1	EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:11)
IgG2	ERKCCVVECPCCP (SEQ ID NO:12)
IgG3	ELKDTPLGDTTHTCPCRCPEPKSCDTPPPCPCRCPEPKSCDTPPPCPCRC (SEQ ID NO:13)
IgG4	ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:14)

15

En algunas realizaciones, el dominio de espaciador se deriva de una región Fc de IgG4 que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

Pos. 219 ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVDSQ EDPEVQFNWY
 Pos. 279 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK
 Pos. 339 AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPVLDL
 Pos. 399 DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSQSVM HEALHNHYTQ KSSLSSLGK (SEQ ID NO:15)

20

En determinadas realizaciones, el dominio de espaciador se deriva de una Fc de IgG4 modificada que incluye uno o más residuos de aminoácidos sustituidos con un residuo de aminoácido diferente del que está presente en una región Fc de IgG4 no modificada. El uno o más residuos de aminoácidos sustituidos se seleccionan entre, pero no se limitan a uno o más residuos de aminoácidos en las posiciones 220, 226, 228, 229, 230, 233, 234, 235, 234, 237, 238, 239, 243, 247, 267, 268, 280, 290, 292, 297, 298, 299, 300, 305, 309, 218, 326, 330, 331, 332, 333, 334, 336, 339, 396, o una combinación de las mismas.

25

En algunas realizaciones, el dominio de espaciador se deriva de una región Fc de IgG4 modificada que incluye, pero no se limita a una o más de las siguientes sustituciones de residuos de aminoácidos: 220S, 226S, 228P, 229S, 230S, 233P, 234A, 234V, 234F, 234A, 235A, 235E, 236A, 237A, 238S, 239D, 243L, 247I, 267E, 268Q, 280H, 290S, 290E, 290N, 292P, 297A, 297Q, 298A, 298G, 298D, 298V, 299A, 300L, 305I, 309L, 318A, 326A, 326W, 326E, 328F, 330L, 330S, 331S, 331S, 332E, 333A, 333S, 333S, 334A, 339D, 339Q, 396L, o una combinación de las mismas, en donde el aminoácido en la región Fc de IgG4 no modificada está sustituido con los aminoácidos arriba identificados en la posición indicada.

30

En algunas realizaciones, el dominio de espaciador se deriva de una región Fc de IgG4 modificada que incluye, pero no se limita a dos o más (es decir, "doble mutada"), tres o más (es decir, "triple mutada"), cuatro o más, cinco o más, o más de cinco de las siguientes sustituciones de residuos de aminoácidos: 220S, 226S, 228P, 229S, 230S, 233P, 234A, 234V, 234F, 234A, 235A, 235E, 236A, 237A, 238S, 239D, 243L, 247I, 267E, 268Q, 280H, 290S, 290E, 290N, 292P, 297A, 297Q, 298A, 298G, 298D, 298V, 299A, 300L, 305I, 309L, 318A, 326A, 326W, 326E, 328F, 330L, 330S, 331S, 331S, 332E, 333A, 333S, 333S, 334A, 339D, 339Q, 396L, o una combinación de las mismas, en donde el aminoácido en la región Fc de IgG4 no modificada está sustituida con los aminoácidos arriba identificados en la posición indicada.

5
10 En algunas realizaciones, el dominio de espaciador se deriva de una región Fc de IgG4 modificada que incluye, pero no se limita a una sustitución de prolina (P) en lugar de serina (S) en la posición 228 (S228P), una sustitución de leucina (L) en lugar de ácido glutámico (E) en la posición 235 (L235E), una sustitución de asparagina (N) en lugar de glutamina (Q) en la posición 297 (N297Q), o una combinación de las mismas. En determinadas realizaciones, una región Fc de IgG4 modificada tiene una única mutación, tal como se indica en las siguientes secuencias de aminoácidos (las mutaciones están en **negrita** y subrayadas):

15
ESKYGPPCPS CPAPEF**EG**GGP SVFLFPPKPK DTLMISRTP E VTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPV L DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (L235E mutation; SEQ ID
NO:16)
ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTP E VTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQF**Q**S TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPV L DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (N297Q mutation; SEQ ID
NO:17)

20 En otras realizaciones, el dominio de espaciador se deriva de una región Fc de IgG4 modificada que es doble mutada para incluir una sustitución de L235E y una sustitución de N297Q ("EQ"). En otra realización, la región Fc de IgG4 modificada es triple mutada para incluir una sustitución S228P, una sustitución L235E y una sustitución N297Q ("S228P + L235E + N297Q"). En determinadas realizaciones, una región Fc de IgG4 y/o de bisagra modificada puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes (las mutaciones están en **negrita** y subrayadas):

ESKYGPPCPS CPAPEF**EG**GGP SVFLFPPKPK DTLMISRTP E VTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQF**Q**S TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPV L DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (EQ mutation; SEQ ID
NO:18)
ESKYGPPC**P** CPAPEF**EG**GGP SVFLFPPKPK DTLMISRTP E VTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQF**Q**S TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPV L DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (S228P+L235E+N297Q
mutation; SEQ ID NO:19)

25 En determinadas realizaciones, el dominio de espaciador se deriva de una región Fc de inmunoglobulina modificada que incluye una o más deleciones de todo o de una parte de su dominio CH2. En una realización, el dominio de espaciador se deriva de una región Fc de IgG4 modificada que incluye una o más deleciones de todo o de una parte de su dominio CH2 ("ch2Δ"). En un aspecto de una realización de este tipo, el dominio de espaciador puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica la siguiente secuencia de aminoácidos:

30
ESKYGPPC**P** CPGGGSSGGG SGGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPV L DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (ch2Δ mutation/deletion;
SEQ ID NO:20)

En algunas realizaciones, el dominio de espaciador puede ser modificado para sustituir la región Fc de inmunoglobulina para un espaciador que no tiene la capacidad de unirse a FcR, tal como la región de bisagra de

CD8a. Alternativamente, se puede eliminar la región de espaciador Fc de la bisagra. Sustituciones de este tipo reducirían o eliminarían la unión de Fc.

5 El término "posición", tal como se utiliza en esta memoria, es una ubicación en la secuencia de una proteína. Las posiciones pueden numerarse secuencialmente o de acuerdo con un formato establecido, por ejemplo, una posición de Kabat o una posición de la UE o un índice de la UE como en Kabat. Para todas las posiciones comentadas en esta memoria, la numeración se realiza de acuerdo con el índice de la UE o el esquema de numeración de la UE (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed., Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda). El índice de la UE o el índice de la UE como en Kabat o el esquema de numeración de la UE se refiere a la numeración del anticuerpo de la UE (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85). Las posiciones de Kabat, aunque también son bien conocidas en la técnica, pueden variar de la posición de la UE para una posición dada. Por ejemplo, las sustituciones S228P y L235E arriba descritas se refieren a la posición de la UE. Sin embargo, estas sustituciones también pueden corresponder a las posiciones de Kabat 241 (S241P) y 248 (L248E). Dominios de transmembrana y de señalización

15 El dominio de señalización intracelular puede incluir cualquier dominio de señalización complejo del receptor de células T (TCR) adecuado, o parte del mismo. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular se deriva de un complejo CD3. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular es un dominio de señalización de cadena zeta (cadena ζ) de TCR. En determinadas realizaciones, un dominio de señalización de cadena ζ puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de la siguiente manera:

20 RVKFSRSADA PAYQQGQNQL YNELNLGRRE EYDVLDKRRG RDPENGGKPR
RKNPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGGHGLY QGLSTATKDT
YDALHMQALP PR (SEQ ID NO:21)

25 El dominio de señalización intracelular puede estar asociado con cualquier dominio coestimulador adecuado que incluye, pero no se limita a un dominio coestimulador de 4-1BB, un dominio coestimulador de OX-40, un dominio coestimulador de CD27, un dominio coestimulador de CD28, un dominio coestimulador de DAP10, un dominio coestimulador inducible (ICOS) o un dominio coestimulador 2B4. De acuerdo con las realizaciones descritas en esta memoria, un CAR puede incluir al menos un dominio coestimulador de señalización. En un aspecto, el CAR tiene un único dominio coestimulador de señalización o puede incluir dos o más dominios coestimuladores de señalización como los arriba descritos. En otro aspecto, el dominio coestimulador puede estar formado por un único dominio coestimulador como los descritos anteriormente o, alternativamente, puede estar compuesto por dos o más porciones de dos o más dominios coestimuladores. Alternativamente, en algunas realizaciones, el CAR no incluye un dominio coestimulador de señalización. En una realización, el CAR incluye un dominio coestimulador de señalización que es un dominio coestimulador de CD28. En esta realización, un dominio coestimulador de CD28 modificado de este tipo puede tener una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos que incluyen, pero no se limitan a una sustitución de leucina-leucina (LL) por glicina-glicina (GG). En determinadas realizaciones, una región de dominio coestimulador de señalización modificada puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes:

35 RSKRSRGGHS DYMNTPRRP GPTRKHYQPY APPRDFAAAYR S (SEQ ID NO:22)

40 El dominio o los dominios de señalización pueden incluir un dominio de transmembrana seleccionado de un dominio de transmembrana CD28, un dominio de transmembrana CD3, o cualquier otro dominio de transmembrana adecuado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el dominio de transmembrana es un dominio de transmembrana CD28. En determinadas realizaciones, una región del dominio coestimulador de señalización modificada puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes:

MFWVLVVGG VLACYSLLVT VAFIIFWV (SEQ ID NO:23)

Expresión de genes CAR y transducción de células T

45 En algunas realizaciones, el gen CAR es parte de un casete de expresión. En algunas realizaciones, el casete de expresión puede - además del gen CAR - incluir también un gen accesorio. Cuando es expresado por una célula T, el gen accesorio puede servir como un marcador de selección de células T transducidas, un marcador de seguimiento *in vivo* o un gen suicida para células T transducidas.

50 En algunas realizaciones, el gen accesorio es un gen EGFR truncado (EGFRt). Se puede utilizar un EGFRt como una herramienta de selección no inmunogénica (p. ej., selección inmunomagnética utilizando cetuximab biotinilado

5 en combinación con microperlas anti-biotina para el enriquecimiento de células T que han sido transducidas lentiviralmente con construcciones que contienen EGFRt), marcador de seguimiento (p. ej., análisis de citometría de flujo para el seguimiento del injerto de células T) y el gen suicida (p. ej., a través de las vías de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por anticuerpos (ADCC) Cetuximab/Erbitux®). Un ejemplo de un gen EGFR truncado (EGFRt) que puede utilizarse de acuerdo con las realizaciones descritas en esta memoria se describe en la Solicitud Internacional N° WO 2011/056894 A2. En otras realizaciones, el gen accesorio es un gen CD19 truncado (CD19t).

10 En otra realización, el gen accesorio es un gen suicida inducible. Un gen suicida es un gen recombinante que hará que la célula en la que se expresa el gen sufra muerte celular programada o aclaramiento mediado por anticuerpos en el momento deseado. En una realización, un gen suicida inducible que puede utilizarse como gen accesorio es un gen de caspasa 9 inducible (véase Straathof et al. (2005). An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. Blood. 1 de junio; 105(11): 4247-4254).

15 En algunas realizaciones, el casete de expresión que incluye un gen CAR arriba descrito se puede insertar en un vector para el suministro - a través de transducción o transfección - de una célula diana. Se puede utilizar cualquier vector adecuado, por ejemplo, un vector bacteriano, un vector viral o un plásmido. En algunas realizaciones, el vector es un vector viral seleccionado de un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector de poxvirus, un vector adenoviral o un vector viral adeno-asociado. En algunas realizaciones, el vector puede transducir una población de células inmunes sanas, p. ej., células T. Células diana transducidas o transfectadas satisfactoriamente expresan uno o más genes que forman parte del casete de expresión.

20 Como tal, una o más poblaciones de células inmunes, tales como células T, pueden ser transducidas con un gen CAR tales como los arriba descritos. Las células T transducidas pueden ser de un donante o pueden ser de un sujeto que tiene cáncer y que necesita un tratamiento para el cáncer. En algunas realizaciones, las células T transducidas se utilizan en un tratamiento de inmunoterapia adoptiva para el tratamiento del cáncer (residuos en negrita/subrayados indican sustituciones). En algunas realizaciones, las células T transducidas expresan un gen
25 CAR que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOS: 24 -27:

CD19R(L235E) 28Z (SEQ ID NO:24) :

```

MLLLVTSLLL CELPHPAFLI IPDIQMTQTT SLSASLGDR VTISCRASQD
ISKYLNWYQQ KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL
EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK
LQESGPGPLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVWIG
SETTYNSAL KSRLTIKDN SKSQVFLKMN SLQTD DTAIY YCAKHYYYGG
SYAMDYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPPCPA PEFEGGSPSVF LFPPKPKDTL
MISRTPEVTC VVVDVSQEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTYR
VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPSS IEKTISKAKG QPREPQVYTL
PPSQEEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTPPVLDSD
GSFFLYSRLT VDKSRWQEGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSLGKMFVW
LVVVGGLVAC YSLLVTVAFI IFWVRSKRSR GGHSYDMMNT PRRPGPTRKH
YQPYAPPRDF AAYRSGGGRV KFSRSADAPA YQQGNQLYN ELNLGRREEY
DVLDKRRGRD PEMGGKPRRK NPQEGLYNEL QKDKMAEAYS EIGMKGERRR
GKGHDGLYQG LSTATKDTYD ALHMQALPPR

```

CD19R(N297Q) 28Z (SEQ ID NO:25) :

```

MLLLVTSLLL CELPHPAFLI IPDIQMTQTT SLSASLGDR VTISCRASQD
ISKYLNWYQQ KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL
EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK
LQESGPGPLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVWIG
SETTYNSAL KSRLTIKDN SKSQVFLKMN SLQTD DTAIY YCAKHYYYGG
SYAMDYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPPCPA PEFLGGSPSVF LFPPKPKDTL
MISRTPEVTC VVVDVSQEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFQSTYR
VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPSS IEKTISKAKG QPREPQVYTL
PPSQEEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTPPVLDSD
GSFFLYSRLT VDKSRWQEGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSLGKMFVW
LVVVGGLVAC YSLLVTVAFI IFWVRSKRSR GGHSYDMMNT PRRPGPTRKH
YQPYAPPRDF AAYRSGGGRV KFSRSADAPA YQQGNQLYN ELNLGRREEY
DVLDKRRGRD PEMGGKPRRK NPQEGLYNEL QKDKMAEAYS EIGMKGERRR
GKGHDGLYQG LSTATKDTYD ALHMQALPPR

```

ES 2 767 423 T3

CD19R(EQ)28Z (SEQ ID NO:26):

```

MLLLVTSLLL CELPHPAFLI IPDIQMTQTT SLSASLGDR VTISCRASQD
ISKYLNWYQQ KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL
EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK
LQESGPGLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVWIG
SETTYNSAL KSRLTIKDN SKSQVFLKMN SLQTDDTAIY YCAKHYYYGG
SYAMDYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPPCPA PEFEGGPSVF LFPPKPKDTL
MISRTPEVTC VVDVVSQEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFQSTYR
VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPSS IEKTISKAKG QPREPQVYTL
PPSQEEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDS
GSFFLYSRLT VDKSRWQEGN VFSCVMHEA LHNHYTQKSL SLSLGMFWV
LVVVGGLVAC YSLLVTVAFI IFWVRSKRSR GGHSYMNMT PRRPGPTRKH
YQPYAPPRDF AAYRSGGGRV KFSRSADAPA YQQGQNQLYN ELNLGRREEY
DVLDKRRGRD PEMGGKPRRK NPQEGLYNEL QKDKMAEAYS EIGMKGERRR
GKGHDGLYQG LSTATKDTYD ALHMQALPPR
    
```

CD19RCH2ACD28Z (SEQ ID NO:27):

```

MLLLVTSLLL CELPHPAFLI IPDIQMTQTT SLSASLGDR VTISCRASQD
ISKYLNWYQQ KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL
EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK
LQESGPGLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVWIG
SETTYNSAL KSRLTIKDN SKSQVFLKMN SLQTDDTAIY YCAKHYYYGG
SYAMDYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPPCPG GGSSGGGSGG QPREPQVYTL
PPSQEEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDS
GSFFLYSRLT VDKSRWQEGN VFSCVMHEA LHNHYTQKSL SLSLGMFWV
LVVVGGLVAC YSLLVTVAFI IFWVRSKRSR GGHSYMNMT PRRPGPTRKH
YQPYAPPRDF AAYRSGGGRV KFSRSADAPA YQQGQNQLYN ELNLGRREEY
DVLDKRRGRD PEMGGKPRRK NPQEGLYNEL QKDKMAEAYS EIGMKGERRR
GKGHDGLYQG LSTATKDTYD ALHMQALPPR
    
```

5 Además, la una o más poblaciones de células T pueden ser parte de una composición farmacéuticamente aceptable para la administración a un sujeto. Además de las células T transducidas por CAR, la composición farmacéuticamente efectiva puede incluir uno o más soportes farmacéuticamente eficaces. Un "soporte farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable que está implicado en llevar o transportar un tratamiento de interés desde un tejido, órgano o porción del cuerpo a otro tejido, órgano o porción del cuerpo. Un vehículo de este tipo puede comprender, 10 por ejemplo, una carga líquida, sólida o semisólida, disolvente, tensioactivo, diluyente, excipiente, adyuvante, aglutinante, tampón, adyuvante de disolución, disolvente, material encapsulante, agente secuestrante, agente dispersante, conservante, lubricante, disgregante, espesante, emulsionante, agente antimicrobiano, antioxidante, agente estabilizante, agente colorante, o alguna combinación de los mismos.

15 Cada uno de los componentes del soporte es "farmacéuticamente aceptable", en el sentido de que debe ser compatible con los otros ingredientes de la composición y debe ser adecuado para el contacto con cualquier tejido, órgano o parte del cuerpo con el que pueda topar, lo que significa que no debe conllevar un riesgo de toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad o cualquier otra complicación que supere excesivamente sus beneficios terapéuticos.

20 Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como soportes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y fécula de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) polímeros naturales, tales como gelatina, colágeno, fibrina, fibrinógeno, laminina, decorina, hialuronano, alginato y quitosano; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, 25 aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerol, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como carbonato de trimetileno, oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tampón, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico (o alginato); (16) agua apirógena; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol, tal como alcohol etílico y alcohol propano; (20) soluciones de tampón fosfato; (21) termoplásticos, tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, (22) poliésteres, tales como policaprolactona; (23) péptidos autoensamblables; y (24) 30 otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas tales como acetona.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como ajuste del pH y agentes tampón, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares.

- 5 En una realización, el soporte farmacéuticamente aceptable es un soporte acuoso, p. ej., solución salina tamponada y similares. En determinadas realizaciones, el soporte farmacéuticamente aceptable es un disolvente polar, p. ej., acetona y alcohol.

10 La concentración de células T transducidas por CAR en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente basándose en volúmenes de fluido, viscosidades, tamaño de los órganos, peso corporal y similares de acuerdo con el modo particular de administración seleccionada y las necesidades del sistema biológico.

15 En determinadas realizaciones, poblaciones de células T transducidas con un gen CAR (es decir, células T transducidas por CAR), tales como las células descritas en esta memoria utilizadas en los métodos para fijar como objetivo y matar las células cancerosas o tumorales, pueden ser cultivadas en un cultivo celular. En determinados aspectos de esta realización, el método puede utilizarse en un entorno *in vitro* o de investigación para investigar el papel de un antígeno relacionado con el cáncer particular en la etiología de un cáncer, o para evaluar las capacidades de fijación como objetivo de las nuevas construcciones de CAR.

Tratamiento del cáncer con células T transducidas por CAR

20 De acuerdo con algunas realizaciones, los genes CAR y poblaciones de células T que son transducidas con genes CAR como los arriba descritos pueden utilizarse en métodos para tratar el cáncer en un sujeto. Métodos de este tipo pueden incluir una etapa de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos una población de células T transducidas con al menos un gen CAR al sujeto. En estas realizaciones, la población de células T transducidas por CAR expresa uno o más genes CAR, tales como los arriba descritos. En determinadas realizaciones, las células T se transducen con y expresan una construcción génica mutante única tal como una construcción CD19R(L235E) o CD19R(N297Q) tal como se describe en esta memoria, una construcción génica doble mutante que tiene tanto una mutación L235E como N297Q (p. ej., CD19R(EQ)), tal como se describe en esta memoria, o una construcción génica de delección (p. ej., CD19Rch2Δ), tal como se describe en esta memoria. Cuando este tipo de células se administra a través de un tratamiento de inmunoterapia adoptiva, las células T transducidas se fijan específicamente como objetivo y lisan las células que expresan el antígeno relacionado con el cáncer (es decir, las células cancerosas) *in vivo*, proporcionando con ello su efecto terapéutico de eliminar células cancerosas.

35 Cánceres que se pueden tratar utilizando la población de células T transducidas pueden incluir, pero no se limitan a, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), cánceres de la corteza suprarrenal, carcinoma, relacionados con el SIDA, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitomas, tumor teratoideo/rabdoideo atípico, sistema nervioso central, carcinoma de células basales, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de hígado, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno, glioma del tallo cerebral, tumores cerebrales, cáncer de mama, tumores bronquiales, linfoma de Burkitt, tumores carcinoides, cánceres del sistema nervioso central, cáncer cervical, cordoma, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica (LMC), trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal, craneofaringioma, linfoma cutáneo de células T, tumores embrionarios, 40 tumores del sistema nervioso central, cáncer de endometrio, ependimoblastoma, ependimoma, cáncer de esófago, esteseoneuroblastoma, familia de tumores de sarcoma de Ewing del tumor de células germinales extracraneal, tumor extragonadal de células germinales cáncer del conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo, histiocitoma fibroso de los huesos, neoplasia y osteosarcoma, cáncer de la vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinóide gastrointestinal, tumores estromales gastrointestinales (GIST) - véase sarcoma de tejido blando, tumor de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, glioma, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de corazón, cáncer hepatocelular (hígado), histiocitosis, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular, tumores de células de los islotes (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe, leucemia, cáncer de labio y de la cavidad oral, cáncer de hígado (primario), carcinoma lobular in situ (CLIS), cáncer de pulmón, linfoma, macroglobulinemia, cáncer de mama en hombres, histiocitoma fibroso maligno de huesos y osteosarcoma, meduloblastoma, meduloeptelioma, melanoma, 45 carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer de cuello escamoso metastásico con carcinoma primario oculto del tracto de la línea media con implicación del gen NUT, cáncer de boca, síndromes de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mieloide aguda (AML), 50 mieloma múltiple, trastornos mieloproliferativos, cáncer de la cavidad nasal y el seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer oral, cáncer de

la cavidad oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno de los huesos, cáncer de ovario, cáncer pancreático, papilomatosis, paraganglioma, cáncer del seno paranasal y de la cavidad nasal, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer faríngeo, feocromocitoma, tumores del parénquima pineal de diferenciación Intermedia, pineoblastoma y tumores supratentoriales primitivos neuroectodérmicos, tumor pituitario, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, cáncer de embarazo y de mama, linfoma del sistema nervioso central (SNC) primario, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células renales (riñón), pelvis y uréter renales, cáncer de células de transición, retinoblastoma, rhabdomioma, cáncer de glándulas salivales, sarcoma, síndrome de Sezary, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer de cuello escamoso, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, linfoma de células T, cutáneo, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales de la pelvis renal y del uréter, tumor trofoblástico, cáncer de uréter y renal, cáncer de la pelvis, cáncer de la uretra, cáncer de útero, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer de la vulva, macroglobulinemia de Waldenström y tumor de Wilms.

La población o poblaciones de células T transducidas con el gen o los genes CAR que pueden utilizarse de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria se pueden administrar, por cualquier vía de administración adecuada, solo o como parte de una composición farmacéutica. Una vía de administración puede referirse a cualquier vía de administración conocida en la técnica, que incluye pero no se limita a intracraneal, parenteral o transdérmica. "Parenteral" se refiere a una vía de administración que generalmente se asocia con la inyección, que incluye infraorbital, por infusión, intraarterial, intracapsular, intracardiaca, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal, intratumoral, intrauterina, intravenosa, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, transmucosal o transtraqueal. En determinadas realizaciones, las células T transducidas se administran por vía intravenosa o intratecal.

La expresión "cantidad eficaz", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una cantidad de un agente, compuesto, tratamiento o terapia que produce un efecto deseado. Por ejemplo, una población de células puede ponerse en contacto con una cantidad efectiva de un agente, compuesto, tratamiento o terapia para estudiar su efecto *in vitro* (p. ej., cultivo celular) o para producir un efecto terapéutico deseado *ex vivo* o *in vitro*. Se puede utilizar una cantidad efectiva de un agente, compuesto, tratamiento o terapia para producir un efecto terapéutico en un sujeto, tal como prevenir o tratar una afección diana, aliviar los síntomas asociados con la afección o producir un efecto fisiológico deseado. En tal caso, la cantidad efectiva de un compuesto es una "cantidad terapéuticamente efectiva", "concentración terapéuticamente efectiva" o "dosis terapéuticamente efectiva". La cantidad efectiva precisa o la cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad de la composición que producirá los resultados más efectivos en términos de eficacia del tratamiento en un sujeto o población de células dado. Esta cantidad variará dependiendo de una diversidad de factores, que incluyen, pero no se limitan a las características del compuesto (incluida la actividad, la farmacocinética, la farmacodinámica y la biodisponibilidad), la condición fisiológica del sujeto (incluida la edad, el sexo, el tipo de enfermedad y el estadio, condición física general, capacidad de respuesta a una dosis dada y tipo de medicamento) o células, la naturaleza del soporte o soportes farmacéuticamente aceptables en la formulación y la vía de administración. Además, una cantidad efectiva o terapéuticamente efectiva puede variar dependiendo de si el compuesto se administra solo o en combinación con otro compuesto, fármaco, terapia u otro método o modalidad terapéutica. Un experto en las técnicas clínica y farmacológica será capaz de determinar una cantidad efectiva o una cantidad terapéuticamente efectiva a través de la experimentación rutinaria, es decir, controlando la respuesta de una célula o sujeto a la administración de un compuesto y ajustando la dosis en consecuencia. Para una orientación adicional, véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21^a Edición, Univ. of Sciences in Philadelphia (USIP), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2005. Agentes, compuestos, tratamientos o terapias que pueden utilizarse en una cantidad efectiva o en una cantidad terapéuticamente efectiva para producir un efecto deseado de acuerdo con las realizaciones descritas en esta memoria pueden incluir, pero no se limitan a un gen CAR, un casete de expresión que incluye un gen CAR, un vector que suministra un casete de expresión que incluye un gen CAR a una célula diana, tal como una célula T, y una población de células T que se transducen con un gen CAR.

Los términos "tratar" o "tratamiento" de una afección pueden referirse a la prevención de la afección, retardar la aparición o la tasa de desarrollo de la afección, la reducción del riesgo de desarrollar la afección, prevenir o retrasar el desarrollo de síntomas asociados con la afección, reducir o terminar los síntomas asociados con la afección, generar una regresión completa o parcial de la afección, o alguna combinación de los mismos. El tratamiento también puede significar un tratamiento profiláctico o preventivo de una afección.

El término "sujeto", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un ser humano o animal, incluyendo todos los mamíferos, tales como primates (particularmente primates superiores), ovejas, perros, roedores (p. ej., ratón o rata), cobayas, cabras, cerdos, gatos, conejos y vacas. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

En determinadas realizaciones, las composiciones para uso en métodos para tratar el cáncer pueden incluir una etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una primera población de células T transducidas con un primer gen CAR en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de una segunda población de células T transducidas con un segundo gen CAR.

5 En otras realizaciones, las células T transducidas por CAR se pueden administrar en combinación con una o más terapias contra el cáncer adicionales. "En combinación" o "en combinación con", tal como se utiliza en esta memoria, significa en el curso de tratar el mismo cáncer en el mismo sujeto utilizando dos o más agentes, fármacos, terapias, procedimientos, regímenes de tratamiento, modalidades de tratamiento o una combinación de los mismos, en cualquier orden. Esto incluye la administración simultánea, así como en un orden espaciado en el tiempo de hasta
10 varios días de diferencia. Un tratamiento combinado de este tipo también puede incluir más de una administración única de uno o más de los agentes, fármacos, agentes terapéuticos, procedimientos, regímenes de tratamiento y modalidades de tratamiento. Además, la administración de los dos o más agentes, fármacos, agentes terapéuticos, procedimientos, regímenes de tratamiento, modalidades de tratamiento o una combinación de los mismos puede realizarse por las mismas o diferentes vías de administración.

15 Terapias contra el cáncer adicionales que pueden utilizarse de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria pueden incluir uno o más procedimientos anti-cáncer, modalidades de tratamiento, agentes terapéuticos anti-cáncer o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, las células T transducidas por CAR pueden administrarse en combinación con uno o más procedimientos o modalidades de tratamiento contra el cáncer que incluyen, pero no se limitan a trasplante de células madre (p. ej., trasplante de médula ósea o trasplante de células
20 madre de la sangre periférica utilizando células madre alogénicas, células madre autólogas; o un trasplante no mieloablato), radioterapia o resección quirúrgica. En otras realizaciones, las células T transducidas por CAR pueden administrarse en combinación con una o más agentes terapéuticos o fármacos anticancerígenos que pueden utilizarse para tratar el cáncer, que incluyen, pero no se limitan a agentes quimioterapéuticos y otros fármacos anticancerígenos, agentes inmunoterapéuticos, agentes terapéuticos fijados como objetivo, o una
25 combinación de los mismos.

Agentes quimioterapéuticos y otros fármacos contra el cáncer que se pueden administrar en combinación con las células T transducidas por CAR de acuerdo con las realizaciones descritas en esta memoria incluyen, pero no se limitan a ácido todo-trans-retinoico (ATRA), trióxido arsénico, antibióticos de antraciclina y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos (p. ej., hidroclicloruro de doxorubicina, hidroclicloruro de daunorrubicina, idarrubicina, mitoxantrona), agentes alquilantes (p. ej., ciclofosfamida, larmustina), análogos de antimetabolitos (citarabina, 6-
30 tioguanina, 6-mercaptipurina, metotrexato), agentes desmetilantes (p. ej., decitabina, 5-azacitidina), inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (p. ej., hidroxiourea), inhibidores de la topoisomerasa (p. ej., etopósido), alcaloides de la vinca (p. ej., sulfato de vincristina), o una combinación de los mismos (p. ej., "ADE", que es un tratamiento combinado que incluye una combinación de citarabina (Ara-C), hidroclicloruro de daunorrubicina y etopósido).

35 Agentes inmunoterapéuticos que se pueden administrar en combinación con las células T transducidas por CAR de acuerdo con las realizaciones descritas en esta memoria incluyen, pero no se limitan a reactivos inmunomoduladores (p. ej., inhibidores de STAT3, lenalidomida) y anticuerpos monoclonales terapéuticos. Los anticuerpos monoclonales terapéuticos pueden diseñarse para fijar como objetivo uno o más antígenos adicionales relacionados con el cáncer.

40 Agentes terapéuticos fijados como objetivo que pueden administrarse en combinación con las células T transducidas por CAR de acuerdo con las realizaciones descritas en esta memoria incluyen, pero no se limitan a inhibidores de tirosina quinasa (imatinib, dasatinib, nilotinib, sunitinib), inhibidores de farnesiltransferasa (p. ej., tipifarnib), inhibidores de FLT e inhibidores de c-Kit (o CD117) (imatinib, dasatinib, nilotinib).

45 Los siguientes Ejemplos están destinados a ilustrar diversas realizaciones de la invención. Como tal, las realizaciones específicas comentadas no deben interpretarse como limitaciones en el alcance de la invención. Por ejemplo, aunque el siguiente ejemplo se refiere a una realización para un CAR que fija como objetivo CD19, se aprecia que se puede generar un CAR para fijar como objetivo a cualquier antígeno.

EJEMPLOS

50 **Ejemplo 1: Receptores de Antígenos Quiméricos (CARs) que Incorporan Mutaciones en la Región de Espaciador Fc de IgG4 Evitan el Reconocimiento Mediado por el Receptor Fc y el Aclaramiento de Células T CAR, Resultando en una Persistencia de las células T y Eficacia Antitumoral Mejoradas**

Para determinar si interacciones mediadas por el FcR celular juegan un papel en el rechazo inmunológico y el aclaramiento, o la activación incluso no intencionada de células T que expresan CAR adoptivamente transferidas, un

CAR específico para CD19 ha sido mutado en uno o dos sitios dentro de la región CH2 (L235E y/o N297Q) de su espaciador Fc de IgG4, al que se alude en esta memoria como CD19R(L235E), CD19R(N297Q) o CD19R(EQ) - así como un CAR específico para CD19 que tiene una delección CH2 en su espaciador Fc de IgG4 - al que se alude en esta memoria como CD19Rch2Δ. Células T que expresan estos CAR mutados se compararon luego con células T que expresan un CAR no mutado (CD19R) o solo una molécula de EGFR truncado (EGFRt) como marcador de seguimiento (Wang et al. 2011), para la unión *in vitro* de FcγR y la actividad citolítica mediada por CAR, así como el injerto *in vivo* y la eficacia terapéutica. Los resultados proporcionan evidencia de que la eliminación de las interacciones celulares de FcγR mejora la persistencia y las respuestas antitumorales de las células T que expresan CAR adoptivamente transferidas.

10 Materiales y Métodos

Construcciones de ADN y Vectores Lentivirales. La construcción lentiviral CD19R28Z-T2A-EGFRt_epHIV7 contiene a) la secuencia del receptor de antígeno quimérico (CAR) que consiste en los segmentos del gen V_H y V_L del mAb (siglas inglesas de anticuerpo monoclonal) FMC63 específico para CD19, una bisagra C_{H2}-C_{H3} de IgG4, los dominios de transmembrana y de señalización citoplasmática de la molécula coestimuladora CD28 que contiene mutaciones gg que potencian la expresión y función del receptor quimérico (Nguyen et al. 2003), y el dominio citoplasmático de la cadena CD3ζ (Kowolik et al. 2006); b) secuencia T2A de salto ribosómico (Szymczak et al. 2004) y c) la secuencia de EGFR truncada (Wang et al. 2011a). El vector lentiviral EGFRt-T2A-DHFR^{FS}-T2A-IMPDH2^{IY}_epHIV7 se generó tal como se describió previamente (Jonnalagadda et al. 2013). Los vectores CD19R(L235E)28Z-T2A-EGFRt_epHIV7, CD19R(N297Q)28Z-T2A-EGFRt_epHIV7 y CD19R(EQ)28Z-T2A-EGFRt_epHIV7 se generaron mediante mutagénesis dirigida al sitio utilizando el kit QuikChange II XL (Agilent Technologies, Santa, Clara, CA) de un plásmido CD19R28Z_pGA optimizado en codones que había sido sintetizado por Geneart, se digirieron con NheI/RsrII y se ligaron con un CD19R28Z-T2A-EGFRt_epHIV7 digerido de manera similar. El vector CD19Rch2Δ28Z-T2A-EGFRt_epHIV7 se generó a partir de un plásmido CD19R-HL-CH3(CO)_pMK-RQ optimizado en codones que había sido sintetizado por Geneart, se digirió con NheI/RsrII y se ligó con un CD19R28Z-T2A-EGFRt_epHIV7 digerido de manera similar.

Líneas Celulares y Mantenimiento. Células mononucleares de la sangre periférica humana (PBMCs) se aislaron tal como se describe (Wang, 2011b) a partir de sangre periférica heparinizada obtenida de kits de descarte que contienen componentes de la sangre residuales de donantes sanos que se habían sometido a aféresis en el City of Hope National Medical Center (COHNMC). Debido a que no se identificó este material de sangre de descarte, se anuló el consentimiento informado con la aprobación de la Junta de Revisión Interna de COHNMC (protocolo IRB nº 09025) y la Oficina de Protección de Sujetos Humanos de COHNMC. El aislamiento de T_{CM} (utilizando el agotamiento de CD14 y CD45RA, seguido de la selección de CD62L), la estimulación de perlas anti-CD3/CD28 y la transducción mediada por lentivirus se realizaron tal como se describió previamente (Wang et al. 2012). En algunos casos, las células T transducidas se enriquecieron inmunomagnéticamente para la expresión de EGFRt tal como se describió previamente (Wang et al. 2011a).

Líneas de células linfoblastoides transformadas con EBV (LCL), y LCL que expresaban OKT3 (LCL-OKT3) (Wang et al. 2011b) o células LCL ffluc⁺ se cultivaron en RPMI 1640 (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) complementado con suero de ternera fetal al 10% inactivado por calor (FCS, Hyclone, Logan, UT) L-glutamina 2 mM (Irvine Scientific) y HEPES 25 mM (Irvine Scientific). Se generaron LCL ffluc⁺ por transducción con el vector lentiviral eGFP-ffluc_epHIV7 a una MOI (siglas inglesas de multiplicidad de infección) de 20 en presencia de 5 µg/ml de polibrono en medio 500 µL, y posterior purificación clasificando células GFP⁺.

Se generaron células de mieloma de ratón que secretan citoquina IL15 homeostática humana (NSO-IL15) tal como se ha descrito previamente (Wang et al. 2011b).

Líneas celulares de leucemia SupB15 y K562 (ATCC) se cultivaron en los medios recomendados por ATCC correspondientes.

Anticuerpos y Citometría de Flujo. Los controles de isotipo conjugado con fluorocromo, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45 y estreptavidina se obtuvieron de BD Biosciences (San Jose, CA). El anti-Fc biotinilado se adquirió de Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA). La generación de cetuximab biotinilado se describió previamente (Wang et al. 2011a). huFcyR1, muFcyR1, huFcyR2a, huFcyR2b y muFcyR2b biotinilados se obtuvieron de Sino Biological, Inc. (Beijing, R.P. de China). El porcentaje de células inmunofluorescentes se analizó mediante un sistema FACScalibur (BD Biosciences) y el porcentaje de células en una región de análisis se calcularon utilizando FCS Express V3 (De Novo Software, CA, EE.UU.).

Injerto de Células T in vivo y Terapia. Todos los experimentos con ratones fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales del Instituto COHNMC. Para los estudios de injerto, se inyectó por vía intravenosa (i.v.)

a ratones (NSG) de 6-10 semanas de edad NOD/Scid IL-2RγC^{nu} el día 0 con 10⁷ de las células derivadas de T_{CM} indicadas, e inyecciones intraperitoneales (i.p.) tres veces una semana de 2x10⁷ NS0-IL15 irradiado para proporcionar un suministro sistémico de IL-15 humana *in vivo*. Se recogió sangre periférica de hemorragias retro-orbitales, se lisaron los glóbulos rojos y se analizaron las suspensiones celulares mediante citometría de flujo. Para el estudio terapéutico se administraron i.v. 1,5 x 10⁶ células LCL ffLuc⁺ a ratones NSG de 6-8 semanas de edad el día 0, y luego se administraron i.v. 5 x 10⁶ de las células derivadas de T_{CM} CAR⁺ indicadas el día 3. La actividad de luciferasa se midió mediante formación de imágenes por Xenogen tal como se describió previamente (Kahlon et al. 2004).

Ensayos de Liberación de cromo. Los ensayos de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas se realizaron tal como se describió previamente (Stastny et al. 2007) utilizando las relaciones de células efectoras/diana indicadas.

Resultados

Células T CD19R+ fracasan en el injerto en ratones NSG. Células T de la memoria central (T_{CM}) como una subpoblación de células T, se han caracterizado por tener un potencial de injerto superior y, por lo tanto, una eficacia terapéutica, después de la transferencia adoptiva (Wang et al. 2011b). Una evidencia adicional ha demostrado que la expresión de CAR en células derivadas de T_{CM} parece correlacionarse con una persistencia *in vivo* disminuida en un modelo de xenoinjerto *in vivo* utilizando ratones NSG. Como indican los estudios descritos en esta memoria, esta disminución de la persistencia se mostró en un experimento que compara el injerto de células derivadas de T_{CM} no transducidas con (i) células derivadas de T_{CM} que fueron transducidas lentiviralmente para expresar tanto un CAR específico para CD19 (CD19R) como un EGFR truncado (EGFRt) como marcador de seguimiento, y (ii) células derivadas de T_{CM} que se transdujeron lentiviralmente para expresar solo el marcador de seguimiento de EGFRt en la superficie celular (FIG. 1). Al observar la sangre periférica recogida 7 y 14 días después de que las células se administraron i.v. en ratones, la tinción con el mAb CD45 anti-humano permitió la detección de células derivadas de T_{CM} no transducidas (FIG. 1c). Sin embargo, tras la tinción conjunta para el marcador de seguimiento de EGFRt para detectar células modificadas por genes, fue evidente que, a pesar del nivel similar de transducción y/o de la expresión de EGFRt de las células de entrada (FIG. 1b, 78-79% positivo), hubo significativamente menos injerto de células en la sangre periférica de ratones que recibieron TCM CD19R/EGFRt⁺ en comparación con los que recibieron TCM EGFRt⁺ (FIG. 1c, p < 0,0001 comparando porcentajes de células CD45/EGFRt⁺ en cada uno de los grupos el día 7 o el día 14 utilizando test t de Student no emparejados). Aunque se detectaron niveles bajos de células T para los ratones tratados con TCM CD19R/EGFRt⁺, todas las células T persistentes los días 7 y 14 fueron CAR negativas. Esta persistencia *in vivo* deteriorada no está asociada con la transducción lentiviral de las células T, ya que es específica para células transducidas para expresar el transgén CAR y no el transgén EGFRt. Además, la ausencia de antígeno CD19 en estos ratones NSG y el hecho de que se haya observado un fenómeno similar con células T que expresan CARs de diferente especificidad antigénica (datos no mostrados) sugiere que la ausencia de injerto/persistencia en la sangre periférica es independiente del antígeno.

HuFcγR se une a células T CD19R+. La construcción CD19R incluye un scFv específico para CD19 derivado del anticuerpo monoclonal de ratón FMC63, un enlazador Fc de IgG4 humano, dominios de transmembrana y citoplasmáticos CD28 humanos y un dominio citoplasmático CD3-zeta humano. Debido a que la construcción CAR incluye una porción de una región Fc de IgG4 humana, se investigó la propensión de respuestas inmunes innatas mediadas por FcR para aclarar selectivamente las células CD19R/EGFRt⁺ - pero no las células EGFRt⁺ -. De hecho, un ensayo de unión utilizando FcγR1 humano soluble reveló que, en contraste con las células derivadas de T_{CM} que no fueron transducidas o que expresaban solo el EGFRt, las que expresaron CD19R exhibieron la unión de las moléculas de FcγR1 que podrían titularse con diluciones más altas (FIG. 2). Es de destacar que se sabe que los ratones NSG, aunque inmunodeficientes, todavía tienen neutrófilos y monocitos que expresan FcR (Ishikawa et al. 2005; Ito et al. 2002), lo que proporciona una justificación potencial para la ausencia de persistencia de células T CAR⁺ observada anteriormente en estudios de injerto.

Generación de mutantes CD19R. Para testar adicionalmente la importancia de potenciales efectos mediados por FcR en la población de T_{CM} que expresa CAR, el CAR específico para CD19 fue mutado en aminoácidos dentro del dominio CH2 de IgG4 que puede estar implicado en la unión de FcR - L235E y/o N297Q (FIG. 3a). También se generó un CAR específico para CD19 con una delección del dominio CH2 de IgG4 (es decir, una delección del dominio que contiene los residuos 235 y 297) (FIG. 3a). Los mutantes individuales resultantes, CD19R(L235E) y CD19R(N297Q), el doble mutante CD19R(EQ) (que tiene mutaciones tanto L235E como N297Q) y las secuencias de delección CD19Rch2Δ se incorporaron en construcciones lentivirales separadas, en donde cada uno se expresó de forma coordinada con EGFRt a partir de una transcripción única, utilizando la secuencia de omisión de ribosomas T2A en un diseño similar al descrito en la FIG. 1a para el CD19R no mutado. Después de la transducción lentiviral, el enriquecimiento inmunomagnético de células que expresan EGFRt, y una sola ronda de rápida expansión, cada una de las líneas derivadas de T_{CM} eran 92-99% positivo para los transgenes esperados (FIG. 3b), lo que demuestra que las mutaciones no afectan negativamente a la expresión de CAR. Además, ninguna de estas mutaciones alteró

el potencial citolítico específico para CD19 de estas células derivadas de T_{CM} en ensayos de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas (FIG. 3c).

La unión de huFcγR a CARs con espaciador de IgG4 mutado está alterada. Para determinar la eficacia de las diferentes mutaciones/delecciones en el CAR para afectar la unión de FcR, se realizó un análisis de citometría de flujo utilizando diversos FcγRs solubles biotinilados humanos y murinos, y PE-estreptavidina (SA-PE) para detectar la unión de los FcγRs a las diferentes poblaciones celulares. Las células T que expresaban el CD19R no mutado estaban unidas por FcγR1, FcγR2a y FcγR2b humano, así como por FcγR1 y FcγR2b murino (FIG. 4). Por el contrario, las células T que expresaban solo EGFRt no estaban unidas por estos FcγRs, y las células T que expresaban los mutantes CD19R(N297Q), CD19R(L235E) o CD19R(EQ), o la delección CD19Rch2Δ, todas mostraban una unión significativamente reducida a estos FcγRs.

Células T con mutantes CD19R exhiben un injerto in vivo y persistencia mejorados. Para determinar si las mutaciones o delecciones de CD19R, que ayudaron a prevenir la unión de FcγR, se traducirían en una persistencia *in vivo* incrementada tras la transferencia adoptiva, 10⁷ células T que expresan el CD19R parental, el marcador EGFRt solo, el CD19R(L235E), el CD19R(N297Q), el CD19R(EQ) o el CD19Rch2Δ se infundieron i.v. en ratones NSG. Una y dos semanas más tarde se analizó la sangre periférica en cuanto al injerto de células CD45⁺ EGFRt⁺ (FIG. 5). Las células EGFRt⁺ injertadas se pudieron detectar cuando las células T expresaron el CD19R(L235E) o CD19R(N297Q) mutado una sola vez. Además, la expresión del CD19Rch(EQ) con mutación en dos puntos o CD19Rch2Δ con CH2 suprimido rescató el injerto de células T, ya que los niveles de células CD45/EGFRt⁺ observados en estos grupos de ratones fueron similares a los observados cuando se expresó EGFRt solo. Este injerto rescatado y la persistencia de las células modificadas por genes también se observó utilizando células derivadas de TCM que no estaban enriquecidas con EGFRt antes de la transferencia adoptiva (FIG. 8).

Células T con mutantes CD19R exhiben una eficacia terapéutica mejorada. En base a los hallazgos del injerto, se compararon los efectos de CD19R(EQ) o CD19Rch2Δ sobre la eficacia antitumoral de las células derivadas de T_{CM}. LCL es una línea celular tumoral que expresa CD19 que se transdujo para expresar luciferasa de luciérnaga (ffLuc) para permitir la monitorización bioluminiscente del crecimiento del tumor *in vivo*. Tres días después de ffLuc⁺ se administró i.v. LCL a ratones NSG, los ratones se trataron i.v. con PBS como control o con 5 x 10⁶ células T que expresaban el CD19R no mutado, el marcador EGFRt solo, el CD19R(EQ) con mutación en dos puntos o el CD19Rch2Δ con CH2 suprimido. La expresión del CD19R(EQ) o del CD19Rch2Δ en las células derivadas de T_{CM} dio como resultado un control significativo del crecimiento del tumor (FIG. 6). Esta eficacia se correlacionó con la presencia/persistencia de las células modificadas genéticamente en la sangre periférica el día 21 (FIG. 6d). De hecho, aunque los grupos de control PBS, CD19R y EGFRt tuvieron que sacrificarse todos el día 21, todos los ratones en los grupos CD19R(EQ) y CD19Rch2Δ sobrevivieron más de 100 días (FIG. 6e). Si bien estos estudios de injerto y eficacia se centraron en el subconjunto TCM de células T, estos hallazgos sugieren que el beneficio positivo de las mutaciones de IgG4 para eliminar la interacción de FcR es independiente de la población de células T que está diseñada. De hecho, la expresión del CD19R(EQ) en células T derivadas de PBMC a granel, en lugar de líneas derivadas de TCM, también dio como resultado una eficacia antitumoral mejorada y una supervivencia a largo plazo ($p = 0,0295$) (FIG. 7).

Discusión

Clínicamente, la eficacia terapéutica *in vivo* de las estrategias de células T adoptivas se correlaciona directamente con el injerto y la persistencia tras la transferencia adoptiva (Heslop et al 2003; Brenner y Heslop 2010). Se han sugerido diversos enfoques para mejorar la persistencia de las células T transferidas, incluida la depleción linfocítica del huésped antes de la transferencia celular (Gattinoni et al. 2005), el soporte de citoquinas después de la transferencia celular (revisado más recientemente en (Overwijk y Schluns 2009) y el uso de población o poblaciones óptimas de células T para transferencia (Berger et al. 2008; Hinrichs et al. 2011; Yang et al. 2013; Gattinoni et al. 2011; Cieri et al. 2013). Los estudios arriba descritos proporcionan evidencia adicional de que el diseño del receptor de antígeno quimérico (CAR) desempeña un papel importante en la dirección del injerto y la persistencia de las células terapéuticas. Anteriormente, el diseño del CAR ha sido explotado para beneficiar el injerto y la persistencia de células terapéuticas mediante la inclusión de dominios de señalización coestimuladores en los CARs de segunda y tercera generación (véase Cartellieri et al. 2010). Sin embargo, como los datos anteriormente también sugieren, las secuencias que se utilizan para conectar el dominio de unión a ligando al o a los dominios de señalización del CAR (conocidos como el espaciador, la bisagra y/o el enlazador) son de importancia previamente no apreciada para el resultado terapéutico *in vivo* en modelos murinos de enfermedad neoplásica. Específicamente, se encontró que el uso de un espaciador Fc de Ig puede inhibir potencialmente el injerto y/o la persistencia de células que expresan CAR en modelos de ratón NSG de una manera que se correlaciona con la unión de FcγR. La prevención de la unión de FcγR mediante mutación puntual o delección de las secuencias relevantes dentro del dominio Fc del CAR puede restaurar entonces la persistencia *in vivo* de las células transferidas adoptivamente a las células que no expresan un

CAR. La persistencia *in vivo* incrementada que es mediada por el CAR optimizado con espaciador se traduce luego en una terapia antitumoral dirigida por CAR significativamente mejorada en un modelo de ratón *in vivo*.

El aclaramiento inmunológico de células T adoptivamente transferidas no es un tema nuevo. Por ejemplo, se ha demostrado que las respuestas de rechazo inmunitario celular contra los genes de selección HyTK y NeoR se expresan de manera coordinada con el CAR (Berger et al. 2006; Jensen et al. 2010). Sin embargo, los estudios arriba descritos destacan la importancia de las respuestas mediadas por FcR contra las células T que expresan CAR para la persistencia de células T *in vivo* y la eficacia antitumoral. Por consiguiente, los estudios también demuestran que existe una 'solución' para evitar esta forma de inmunogenicidad – a saber, la incorporación de mutaciones en el diseño del CAR para evitar el reconocimiento de FcγR.

En base a estos resultados, las mutaciones descritas en esta memoria pueden extrapolarse a seres humanos y, por lo tanto, deberían aumentar la persistencia y la eficacia terapéutica de las células T que expresan espaciadores de IgG que contienen CAR en seres humanos. Cualquier discrepancia en el injerto de células T CAR y la eficacia antitumoral *in vivo* probablemente se ve afectada por la naturaleza del sistema modelo NSG murino. Se ha demostrado que la IgG4 humana se une eficazmente a los FcRs murinos para mediar en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos potentes (Isaacs et al. Steplewski et al. 1988). En contraste, los FcRs humanos tienen la mayor afinidad hacia IgG1 e IgG3, y una afinidad reducida por IgG4 (Schroeder y Cavacini 2010; Nirula et al. 2011). Adicionalmente, dado que ratones NSG carecen de anticuerpos séricos, los FcRs expresados por sus células inmunes innatas están desocupados y, por lo tanto, tienen un mayor potencial para unirse al espaciador Fc de IgG dentro del CAR. Con la excepción de los casos de hipoglobulinemia, los seres humanos inmunocompetentes tienen niveles altos de IgG en suero de aproximadamente 10 mg/mL (Stoop et al., 1969), lo que podría competir potencialmente por el reconocimiento de CARs que contienen IgG. De hecho, varios grupos han administrado células T CAR portadoras de Fc de IgG a seres humanos, y en algunos casos se detectaron niveles bajos de células T CAR mediante PCR cuantitativa hasta 6 semanas (Savoldo et al. 2011) e incluso un año (Till et al. 2012) después de la administración. La incorporación de las mutaciones descritas en esta memoria probablemente mejoraría adicionalmente esta persistencia de células T CAR en seres humanos.

En general, los estudios aquí presentados proporcionan evidencia de que CARs que contienen componentes de un espaciador Fc de Ig deberían incorporar modificaciones que impiden el reconocimiento mediado por FcR de las células *in vivo*. Dichas modificaciones pueden implicar mutaciones puntuales para cambiar la secuencia de aminoácidos, o deleciones de secuencia como la observada con las construcciones CD19R(EQ) y CD19Rch2Δ descritas en esta memoria. Tales modificaciones no solo impedirán la capacidad de las células que expresan FcR para reconocer el producto celular inmunoterapéutico que expresa CAR *in vivo*, sino que también podrían prevenir la activación involuntaria de las células T transferidas y/o las respuestas inmunes del huésped (Hombach et al. 2010), lo que podría contribuir a diversos efectos secundarios no deseados de esta estrategia inmunoterapéutica.

REFERENCIAS

Berger, C, Jensen, MC, Lansdorp, PM, Gough, M, Elliott, C y Riddell, SR (2008). Adoptive transfer of effector CD8 T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J Clin Invest* 118: 294-305.

Berger, C, Flowers, ME, Warren, EH, and Riddell, SR (2006). Analysis of transgene-specific immune responses that limit the *in vivo* persistence of adoptively transferred HSV-TK-modified donor T cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 107: 2294-2302.

Brenner, MK y Heslop, HE (2010). Adoptive T cell therapy of cancer. *Curr Opin Immunol* 22: 251-257.

Brentjens, RJ, Santos, E, Nikhamin, Y, Yeh, R, Matsushita, M, La Perle, K, et al. (2007). Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Clin Cancer Res* 13: 5426-5435.

Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, Bartido S, Stefanski J, Taylor C, Olszewska M, Borquez-Ojeda O, Qu J, Wasielewska T, He Q, Bernal Y, Rijo IV, Hedvat C, Kobos R, Curran K, Steinherz P, Jurcic J, Rosenblat T, Maslak P, Frattini M, Sadelain M. (2013) CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med.* 5(177):177

Brentjens RJ, Riviere I, Park JH, Davila ML, Wang X, Stefanski J, Taylor C, Yeh R, Bartido S, Borquez-Ojeda O, Olszewska M, Bernal Y, Pegram H, Przybylowski M, Hollyman D, Usachenko Y, Pirraglia D, Hosey J, Santos E, Halton E, Maslak P, Scheinberg D, Jurcic J, Heaney M, Heller G, Frattini M, Sadelain M. (2012) Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood.* 118(18):4817-28.

- Cartellieri, M, Bachmann, M, Feldmann, A, Bippes, C, Stamova, S, Wehner, R, et al. (2010). Chimeric antigen receptor-engineered T cells for immunotherapy of cancer. *J Biomed Biotechnol* 2010: 956304.
- Cieri, N, Camisa, B, Cocchiarella, F, Forcato, M, Oliveira, G, Provassi, E, et al. (2013). IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. *Blood* 121: 573-584.
- 5 De Oliveira, SN, Ryan, C, Giannoni, F, Hardee, CL, Tremcinska, I, Katebian, B, et al. (2013). Modification of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells with CD19-18 Specific Chimeric Antigen Receptors as a Novel Approach for Cancer Immunotherapy. *Hum Gene Ther* 24: 824-839.
- Gattinoni, L, Finkelstein, SE, Klebanoff, CA, Antony, PA, Palmer, DC, Spiess, PJ, et al. (2005). Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *J Exp Med* 202: 907-912.
- 10 Gattinoni, L, Lugli, E, Ji, Y, Pos, Z, Paulos, CM, Quigley, MF, et al. (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med* 17: 1290-1297.
- Grupp S. A., Kalos M., Barrett D., Aplenc R., Porter D. L., Rheingold S. R., et al. (2013). Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 368, 1509-1518.
- 15 Guest, RD, Hawkins, RE, Kirillova, N, Cheadle, EJ, Arnold, J, O'Neill, A, et al. (2005). The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens. *J Immunother* 28: 203-211.
- Haso, W, Lee, DW, Shah, NN, Stetler-Stevenson, M, Yuan, CM, Pastan, IH, et al. (2013). Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 121: 1165-1174.
- 20 Heslop, HE, Stevenson, FK, and Molldrem, JJ (2003). Immunotherapy of hematologic malignancy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 331-349.
- Hinrichs, CS, Borman, ZA, Gattinoni, L, Yu, Z, Burns, WR, Huang, J, et al. (2011). Human effector CD8+ T cells derived from naive rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy. *Blood* 117: 808-814.
- 25 Hombach, A, Wierzchowiec, A, Marquardt, T, Heuser, C, Usai, L, Pohl, C, et al. (2001). Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule. *J Immunol* 167: 6123-6131.
- Hombach, A, Hombach, AA, and Abken, H (2010). Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: modification of the IgG1 Fc 'spacer' domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids 'off-target' activation and unintended initiation of an innate immune response. *Gene Ther* 17:1206-1213.
- 30 Huang, G, Yu, L, Cooper, LJ, Hollomon, M, Huls, H, and Kleinerman, ES (2012). Genetically modified T cells targeting interleukin-11 receptor alpha-chain kill human osteosarcoma cells and induce the regression of established osteosarcoma lung metastases. *Cancer Res* 72: 271-281.
- 35 Hudecek, M, Lupo-Stanghellini, MT, Kosasih, PL, Sommermeyer, D, Jensen, MC, Rader, C, et al. (2013). Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells. *Clin Cancer Res* 19: 3153-3164.
- Hudecek, M, Schmitt, TM, Baskar, S, Lupo-Stanghellini, MT, Nishida, T, Yamamoto, TN, et al. (2010). The B-cell tumor-associated antigen ROR1 can be targeted with T cells modified to express a ROR1-specific chimeric antigen receptor. *Blood* 116: 4532-4541.
- 40 Imai, C, Mihara, K, Andreatsky, M, Nicholson, IC, Pui, CH, Geiger, TL, et al. (2004). Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 18: 676-684.
- Isaacs, JD, Greenwood, J y Waldmann, H (1998). Therapy with monoclonal antibodies. II. The contribution of Fc gamma receptor binding and the influence of C(H)1 and C(H)3 domains on in vivo effector function. *J Immunol* 161: 3862-3869.
- 45

- Ishikawa, F, Yasukawa, M, Lyons, B, Yoshida, S, Miyamoto, T, Yoshimoto, G, et al. (2005). Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. *Blood* 106: 1565-1573.
- 5 Ito, M, Hiramatsu, H, Kobayashi, K, Suzue, K, Kawahata, M, Hioki, K, et al. (2002). NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100: 3175-3182.
- Jensen, MC, Popplewell, L, Cooper, LJ, DiGiusto, D, Kalos, M, Ostberg, JR, et al. (2010). Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humans. *Biol Blood Marrow Transplant* 16: 1245-1256.
- 10 Jonnalagadda, M, Brown, CE, Chang, WC, Ostberg, JR, Forman, SJ y Jensen, MC (2013). Engineering human T cells for resistance to methotrexate and mycophenolate mofetil as an in vivo cell selection strategy. *PLoS One* 8: e65519.
- Kahlon, KS, Brown, C, Cooper, LJ, Raubitschek, A, Forman, SJ, and Jensen, MC (2004). Specific recognition and killing of glioblastoma multiforme by interleukin 13-zetakine redirected cytolytic T cells. *Cancer Res* 64: 9160-9166.
- 15 Kalos, M, Levine, BL, Porter, DL, Katz, S, Grupp, SA, Bagg, A, et al. (2011). T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 3: 95ra73.
- Kebriaei, P, Huls, H, Jena, B, Munsell, M, Jackson, R, Lee, DA, et al. (2012). Infusing CD19-directed T cells to augment disease control in patients undergoing autologous hematopoietic stem-cell transplantation for advanced B-lymphoid malignancies. *Hum Gene Ther* 23: 444-450.
- 20 Kochenderfer, JN, Feldman, SA, Zhao, Y, Xu, H, Black, MA, Morgan, RA, et al. (2009). Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Immunother* 32: 689-702.
- Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, Wilson WH, Spaner DE, Marie I, Stetler-Stevenson M, Phan GQ, Hughes MS, Sherry RM, Yang JC, Kammula US, Devillier L, Carpenter R, Nathan DA, Morgan RA, Laurencot C, Rosenberg SA. (2012). B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*. 119(12):2709-20.
- 25 Kowolik, CM, Topp, MS, Gonzalez, S, Pfeiffer, T, Olivares, S, Gonzalez, N, et al. (2006). CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. *Cancer Res* 66: 10995-11004.
- Mardiros, A, Dos Santos, C, McDonald, T, Brown, CE, Wang, X, Budde, LE, et al. (2013). T cells expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions and anti-tumor effects against human acute myeloid leukemia. *Blood*.
- 30 Milone, MC, Fish, JD, Carpenito, C, Carroll, RG, Binder, GK, Teachey, D, et al. (2009). Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Mol Ther* 17: 1453-1464.
- 35 Nguyen, P, Moisini, I y Geiger, TL (2003). Identification of a murine CD28 dileucine motif that suppresses single-chain chimeric T-cell receptor expression and function. *Blood* 102: 4320-4325.
- Nirula, A, Glaser, SM, Kalled, SL y Taylor, FR (2011). What is IgG4? A review of the biology of a unique immunoglobulin subtype. *Curr Opin Rheumatol* 23: 119-124.
- 40 Overwijk, WW y Schluns, KS (2009). Functions of gammaC cytokines in immune homeostasis: current and potential clinical applications. *Clin Immunol* 132: 153-165.
- Reddy, MP, Kinney, CA, Chaikin, MA, Payne, A, Fishman-Lobell, J, Tsui, P, et al. (2000). Elimination of Fc receptor-dependent effector functions of a modified IgG4 monoclonal antibody to human CD4. *J Immunol* 164: 1925-1933.
- Savoldo, B, Ramos, CA, Liu, E, Mims, MP, Keating, MJ, Carrum, G, et al. (2011). CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest* 121: 1822-1826.
- 45

- Sazinsky, SL, Ott, RG, Silver, NW, Tidor, B, Ravetch, JV y Wittrup, KD (2008). Aglycosylated immunoglobulin G1 variants productively engage activating Fc receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20167-20172.
- Schroeder, HW, Jr. y Cavacini, L (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 125: S41-52.
- 5 Stastny, MJ, Brown, CE, Ruel, C y Jensen, MC (2007). Medulloblastomas expressing IL13Ralpha2 are targets for IL13-zetakine+ cytolytic T cells. *J Pediatr Hematol Oncol* 29: 669-677.
- Steplewski, Z, Sun, LK, Shearman, CW, Ghrayeb, J, Daddona, P y Koprowski, H (1988). Biological activity of human-mouse IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 chimeric monoclonal antibodies with antitumor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 4852-4856.
- 10 Stoop, JW, Zegers, BJ, Sander, PC y Ballieux, RE (1969). Serum immunoglobulin levels in healthy children and adults. *Clin Exp Immunol* 4: 101-112.
- Strohl, WR (2009). Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. *Curr Opin Biotechnol* 20:685-691.
- 15 Szymczak, AL, Workman, CJ, Wang, Y, Vignali, KM, Dilioglou, S, Vanin, EF, et al. (2004). Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'selfcleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat Biotechnol* 22: 589-594.
- Till, BG, Jensen, MC, Wang, J, Qian, X, Gopal, AK, Maloney, DG, et al. (2012). CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood* 119: 3940-3950.
- 20 Wang, X, Naranjo, A, Brown, CE, Bautista, C, Wong, CW, Chang, WC, et al. (2012). Phenotypic and Functional Attributes of Lentivirus-modified CD19-specific Human CD8+ Central Memory T Cells Manufactured at Clinical Scale. *J Immunother* 35: 689-701.
- Wang, X, Chang, WC, Wong, CW, Colcher, D, Sherman, M, Ostberg, JR, et al. (2011a). A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood* 118: 1255-1263.
- 25 Wang, X, Berger, C, Wong, CW, Forman, SJ, Riddell, SR y Jensen, MC (2011b). Engraftment of human central memory-derived effector CD8+ T cells in immunodeficient mice. *Blood* 117: 1888-1898.
- Wilkie, S, Picco, G, Foster, J, Davies, DM, Julien, S, Cooper, L, et al. (2008). Retargeting of human T cells to tumor associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor. *J Immunol* 180: 4901-4909.
- Yang, S, Ji, Y, Gattinoni, L, Zhang, L, Yu, Z, Restifo, NP, et al. (2013). Modulating the differentiation status of ex vivo-cultured anti-tumor T cells using cytokine cocktails. *Cancer Immunol Immunother* 62: 727-736.
- 30 Zhong, XS, Matsushita, M, Plotkin, J, Riviere, I y Sadelain, M (2010). Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8+ T cell-mediated tumor eradication. *Mol Ther* 18: 413-420.

REIVINDICACIONES

1. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) recombinante que tiene una unión deteriorada a un receptor Fc (FcR), que comprende:
un dominio de reconocimiento de antígeno;
5 un dominio de espaciador que comprende la secuencia de aminoácidos
ESKYGPPCPPCPGGSSGGSGGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQ
EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK;
un dominio de transmembrana;
un dominio de señalización intracelular, en donde el dominio de señalización intracelular es un dominio de
señalización de cadena zeta del receptor de células T (TCR); y
10 uno o más dominios de señalización intracelular coestimuladores derivados de CD28, coestimuladores inducibles
(ICOS), OX40, CD27, DAP10, 4-1BB, p561ck o 2B4.
2. El CAR recombinante de la reivindicación 1, en donde el dominio de reconocimiento de antígeno es un scFv.
3. El CAR recombinante de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el dominio de reconocimiento de antígeno fija como
15 objetivo un antígeno asociado a cáncer seleccionado del grupo que consiste en 5T4, 8H9, integrina $\alpha\beta 6$, alfa-
fetoproteína (AFP), B7-H6, CA-125, anhidrasa carbónica 9 (CA9), CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, CD44,
CD44v6, CD44v7/8, CD52, CD123, CD171, antígeno carcinoembrionario (CEA), EGFRvIII, glucoproteína-2 epitelial
(EGP-2), glucoproteína-40 epitelial (EGP-40), ErbB1/EGFR, ErbB2/HER2/neu/EGFR2, ErbB3, ErbB4, antígeno
20 tumoral epitelial (ETA), FBP, receptor de acetilcolina fetal (AChR), receptor de folato α , G250/CAIX, gangliósido 2
(GD2), gangliósido 3 (GD3), HLA-A1, HLA-A2, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA),
receptor de IL-13 $\alpha 2$, KDR, cadena ligera k, Lewis Y (LeY), molécula de adhesión celular L1, antígeno asociado a
melanoma (MAGE-A1), mesotelina, células infectadas con CMV murino, mucina-1 (MUC1), mucina-16 (MUC16),
ligandos del miembro D del grupo asesino natural 2 (NKG2D), molécula de adhesión de células nerviosas (NCAM),
NY-ESO-1, antígeno oncofetal (h5T4), antígeno de células madre prostáticas (PSCA), antígeno de membrana
25 específico para la próstata (PSMA), receptor huérfano 1 similar al receptor de tirosina quinasa (ROR1), TAA fijado
como objetivo por el mAb IgE, glucoproteína 72 asociada al tumor (TAG-72), tirosinasa y receptores del factor de
crecimiento endotelial vascular (VEGF).
4. El CAR recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el CAR es codificado por una
secuencia de ácido nucleico que está insertada dentro de un vector viral.
5. Una población aislada de células inmunes humanas transducidas por un vector viral que comprende un casete de
30 expresión que incluye un gen CAR, comprendiendo el gen una secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de
antígeno quimérico (CAR) recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la población de células
inmunes humanas expresa el gen CAR.
6. Una población aislada de células inmunes humanas transducidas con un gen CAR para su uso en un método de
tratamiento de un cáncer en un sujeto, en donde el gen CAR comprende una secuencia de nucleótidos que codifica:
35 un dominio de reconocimiento de antígeno que se dirige a un antígeno asociado al cáncer específico para el cáncer;
un dominio de espaciador que comprende la secuencia de aminoácidos
ESKYGPPCPPCPGGSSGGSGGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQ
EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK;
un dominio de señalización intracelular, en donde el dominio de señalización intracelular es un dominio de
señalización de cadena zeta del receptor de células T (TCR); y
40 uno o más dominios de señalización intracelular coestimuladores derivados de CD28, coestimuladores inducibles
(ICOS), OX40, CD27, DAP10, 4-1BB, p561ck o 2B4.
7. La población aislada de células inmunes humanas para uso en un método de tratamiento de un cáncer en un
sujeto de la reivindicación 6, en donde la unión alterada al FcR resulta en una persistencia mejorada de las células
inmunes humanas en comparación con las células inmunes humanas transducidas con un gen CAR que comprende
45 una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de espaciador derivado de una región Fc de inmunoglobulina
no modificada.

8. La población aislada de células inmunes humanas para uso en un método de tratamiento de un cáncer en un sujeto de las reivindicaciones 6 o 7, comprendiendo dicho método, además, administrar la población de células inmunes humanas transducidas con el gen CAR en combinación con una o más terapias anti-cáncer, seleccionadas de trasplante de células madre, radioterapia, resección quirúrgica, quimioterapia, inmunoterapia, terapia fijada como objetivo o una combinación de las mismas.
- 5

FIG. 1

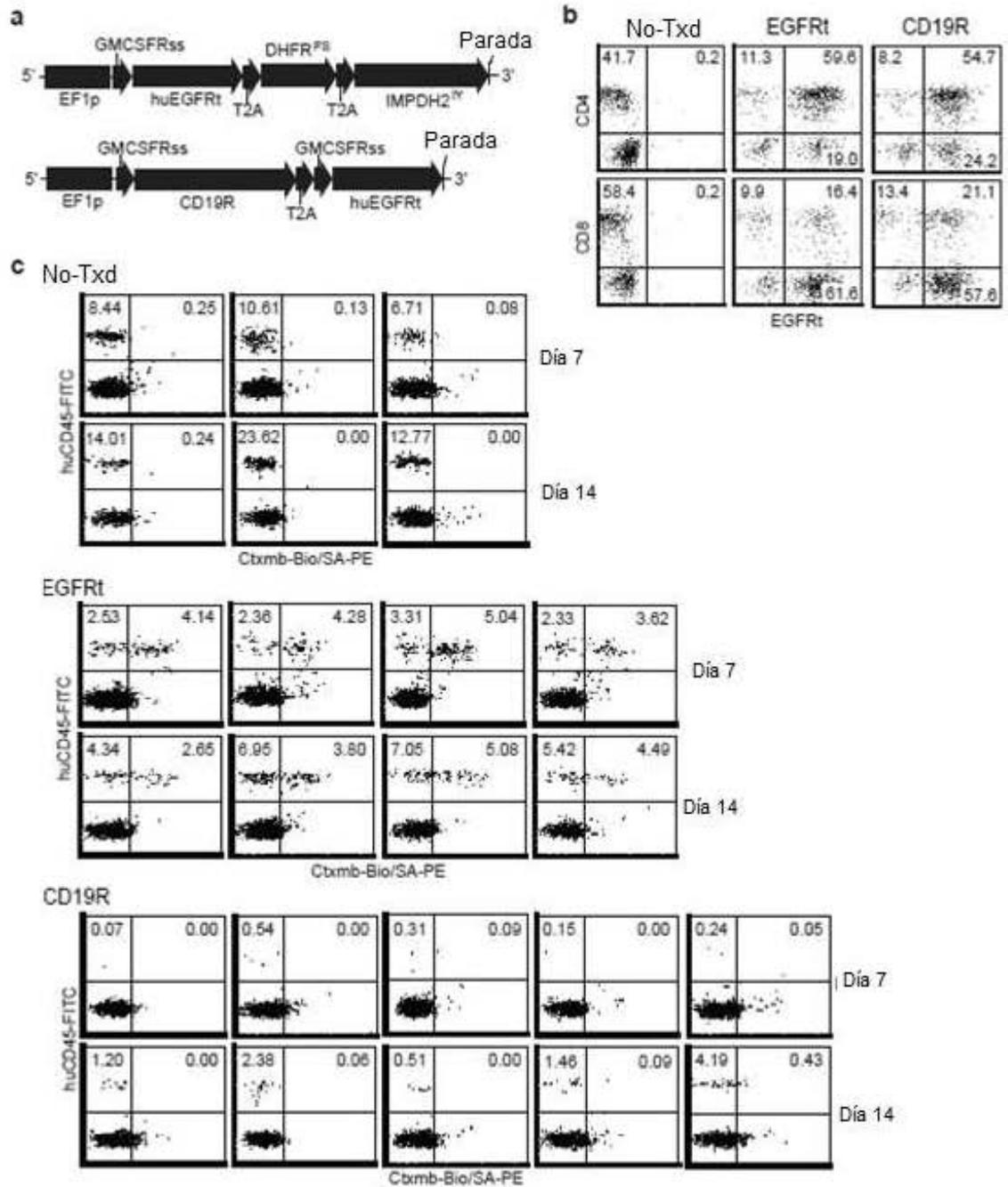


FIG. 2

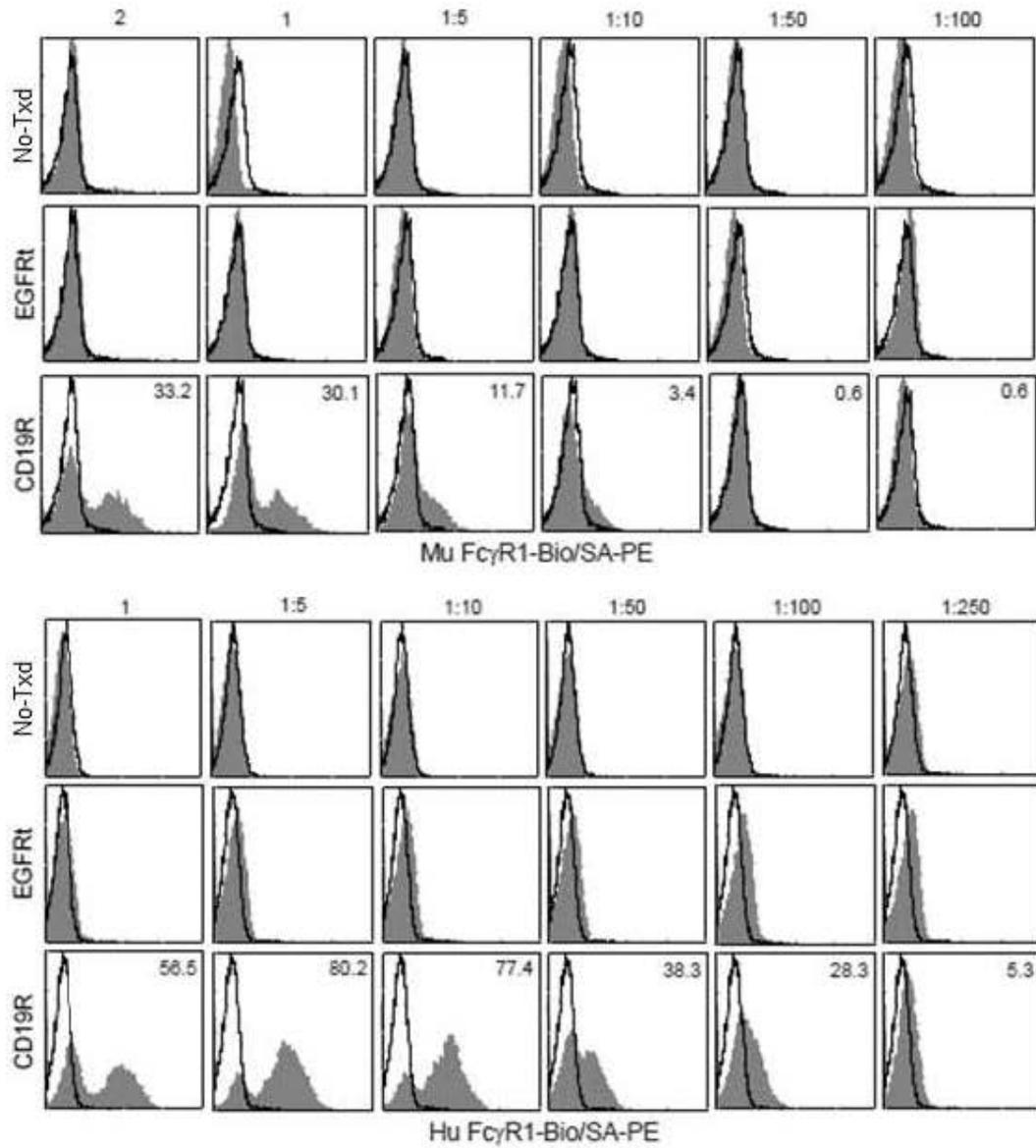


FIG. 3

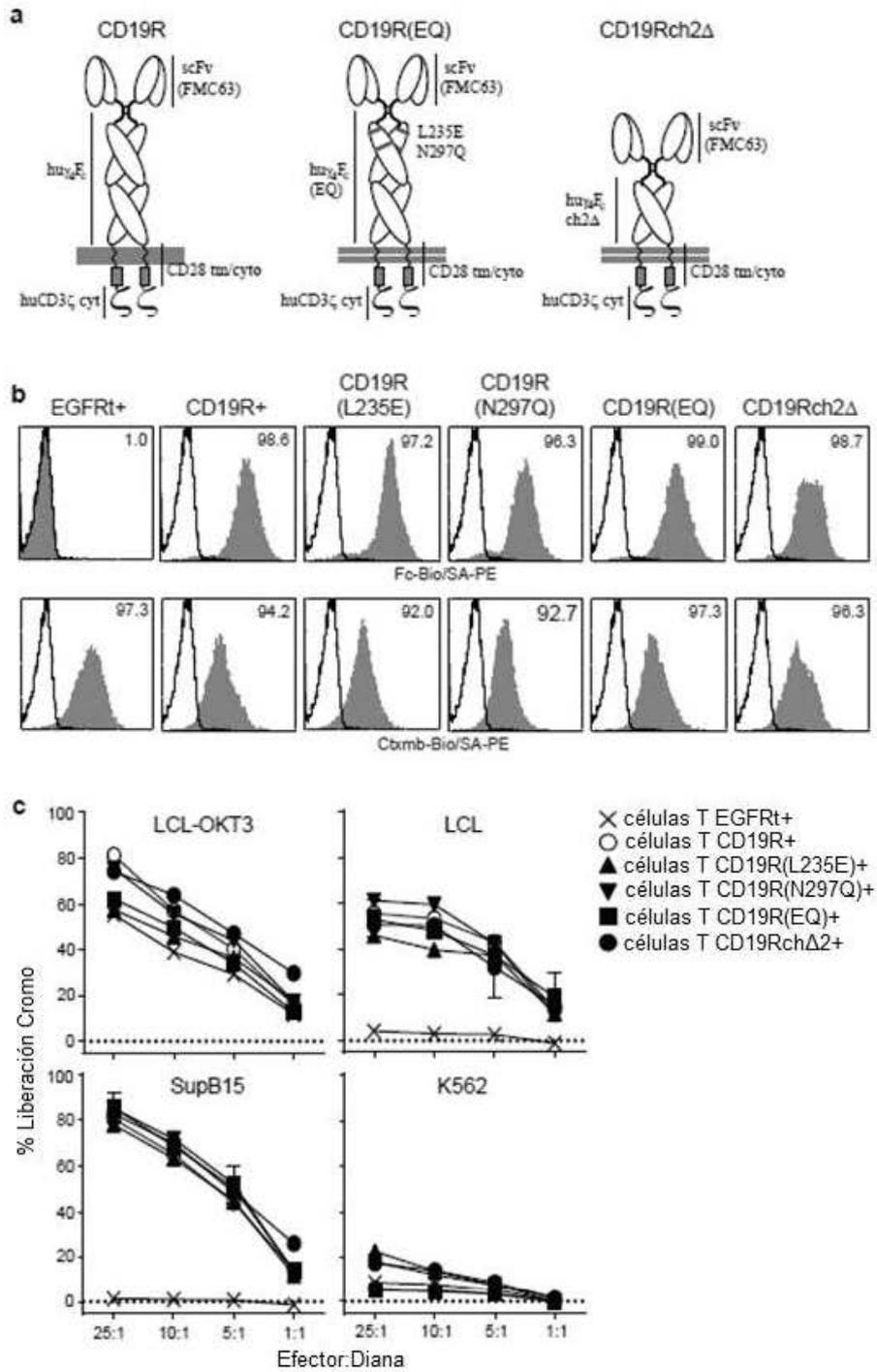


FIG. 4

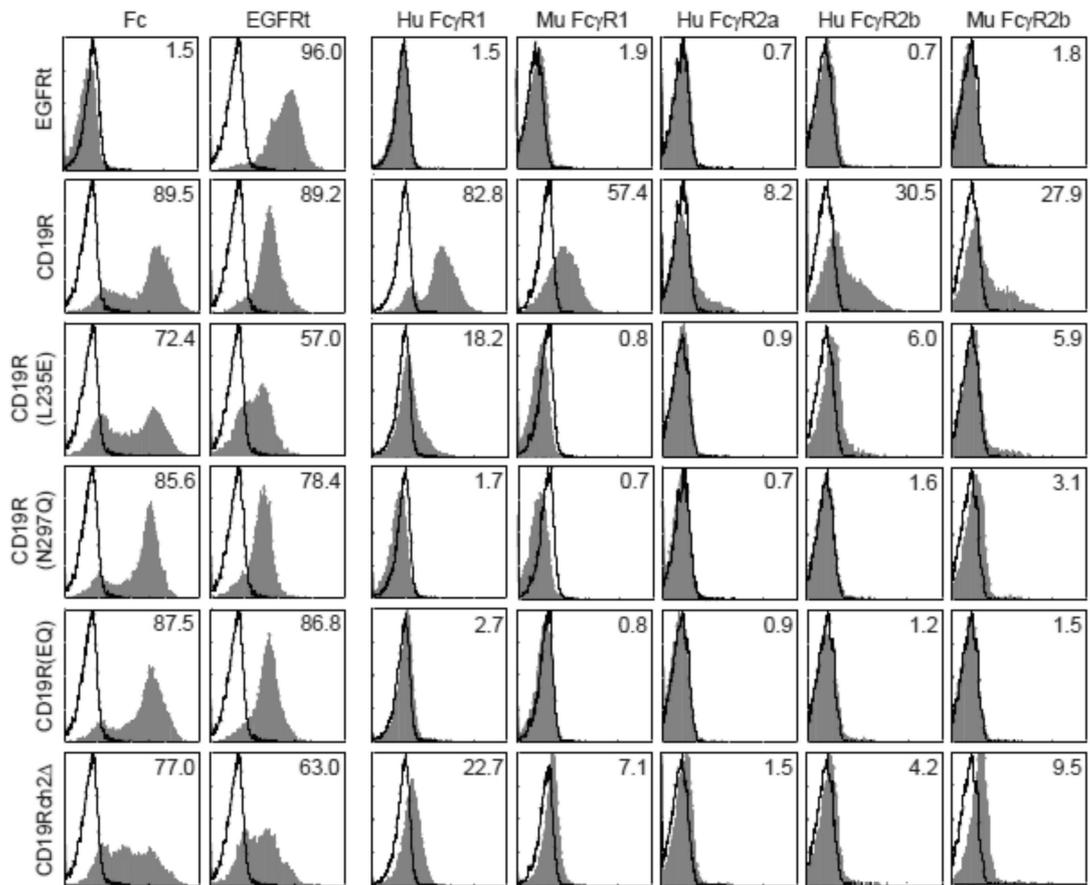


FIG. 5

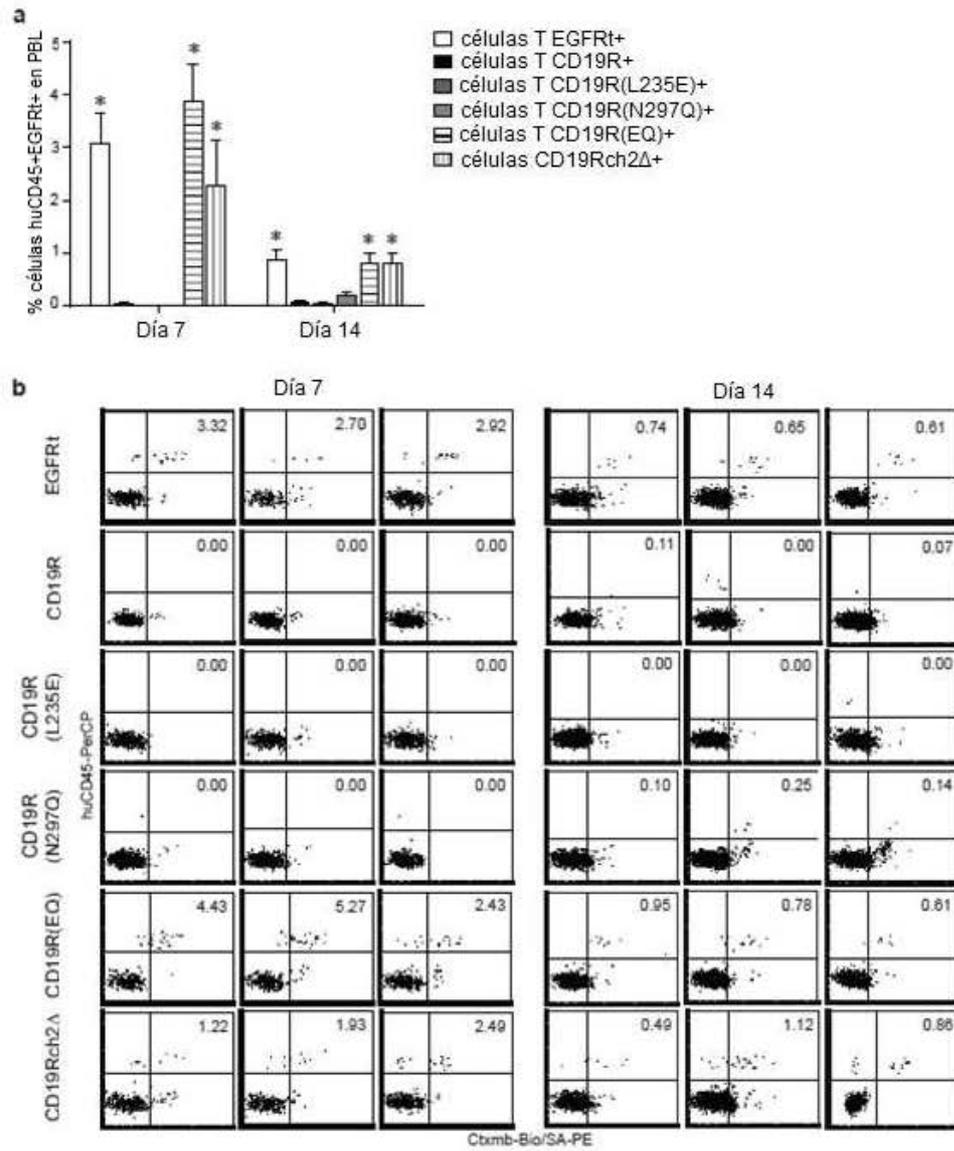


Fig. 6

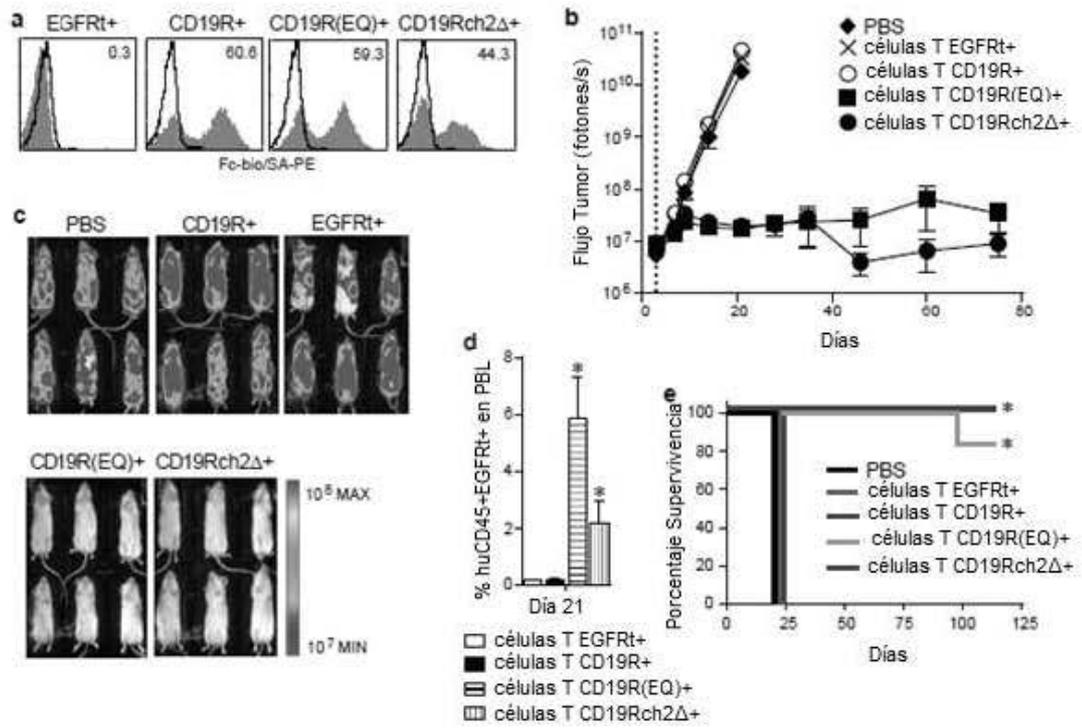


Fig. 7

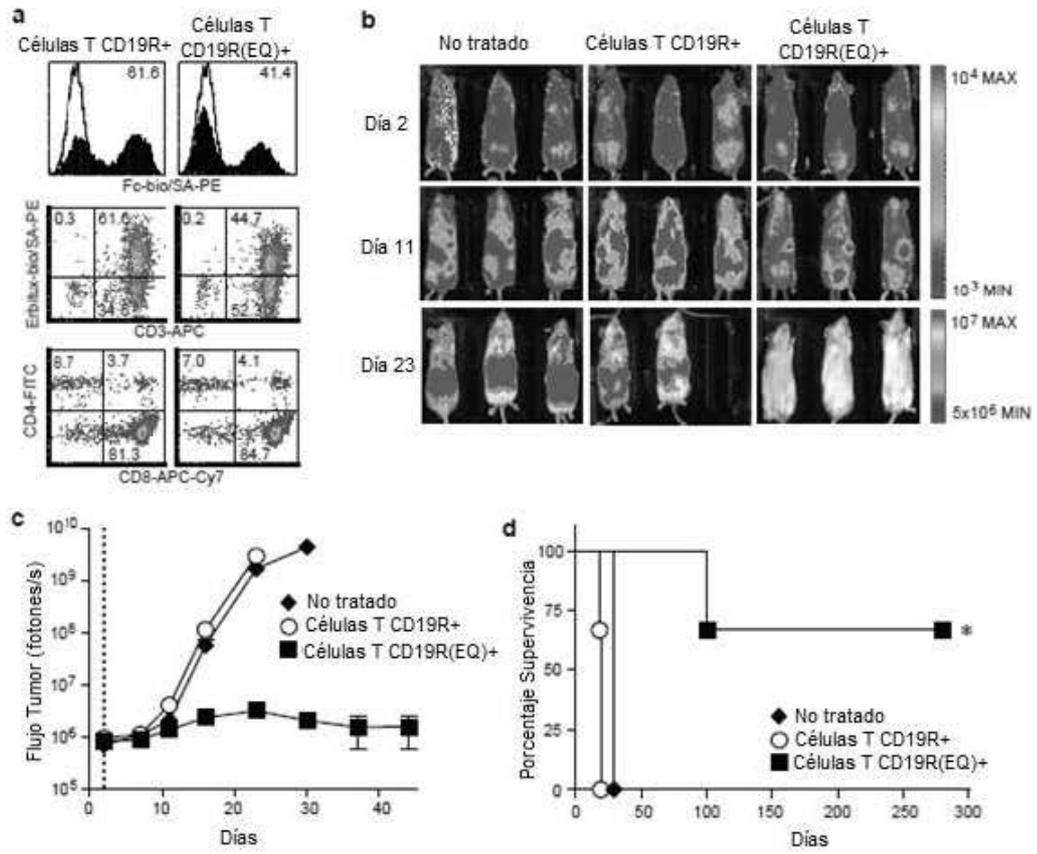


Fig. 8

