

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 698**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4985 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61K 31/551 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 47/55 (2007.01)

A61K 47/69 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013 PCT/US2013/076986**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14100615**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013 E 13864097 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 2934532**

54 Título: **Células T que expresan un receptor antigénico quimérico como terapia contra el cáncer**

30 Prioridad:

20.12.2012 US 201261740384 P

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

31.07.2020

73 Titular/es:

**PURDUE RESEARCH FOUNDATION (100.0%)
Office of Technology Commercialization, 1801
Newman Road
West Lafayette, IN 47906, US**

72 Inventor/es:

**LOW, PHILIP;
CHU, HAIYAN y
LEE, YONG GU**

74 Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

ES 2 776 698 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

Células T que expresan un receptor antigénico quimérico como terapia contra el cáncer

5 **Antecedentes de la invención**

La inmunoterapia basada en la transferencia adoptiva de linfocitos (por ejemplo, células T) en un paciente pueden tener un papel importante en la eliminación del cáncer. Entre los muchos tipos diferentes de agentes inmunoterapéuticos, uno de los métodos terapéuticos más prometedores que se están desarrollando son las células T que expresan Receptores Antigénicos Quiméricos (Chimeric Antigen Receptors, CAR). Los CAR son receptores modificados genéticamente que están diseñados para dirigirse a un antígeno específico de un tumor seleccionado [1]. Por ejemplo, las células T que tienen una actividad citotóxica se transfectan con y se cultivan para que expresen los CAR de manera que las células T que expresan CAR pueden dirigirse y destruir tumores mediante antígenos asociados al tumor.

Los CAR de primera generación estaban compuestos por dos regiones principales. La primera, una región de reconocimiento, por ejemplo, una región de fragmento variable de cadena sencilla (single chain fragment variable, scFv) derivado de un anticuerpo dirigido contra un tumor, para reconocer y unirse a antígenos asociados con un tumor. La segunda un dominio de señalización de activación, por ejemplo, la cadena CD3 ζ de las células T, que sirve como señal de activación de las células T en los CAR [2]. Aunque las células T transducidas para que expresen dichas construcciones presentaban resultados positivos *in vitro*, se ha descubierto que tienen una actuación limitada en la eliminación de células tumorales en los ensayos clínicos. La principal limitación ha sido la incapacidad relativa para prolongar y expandir la población de células T y conseguir unos efectos antitumorales sostenidos *in vivo*.

Para afrontar estos problemas, se incluye un dominio de co-estimulación (por ejemplo, de CD137, CD28 o CD134) en los CAR de segunda generación para conseguir la activación completa, prolongada de las células T. La adición de un dominio de co-estimulación aumenta la proliferación *in vivo* y la supervivencia de las células T que contienen los CAR, y los datos clínicos iniciales han demostrado que dichas construcciones son un agente terapéutico prometedor en el tratamiento de tumores [3].

Aunque el uso de células T que expresan CAR como agente inmunoterapéutico se muestra prometedor, aún existen muchos desafíos a superar con el fin de conseguir resultados clínicos significativos. En primer lugar, puede haber un resultado de toxicidades "fuera de diana" debido al hecho de que es difícil dirigirse solo a las células cancerosas mediante antígenos asociados al tumor debido a que en muchos casos las células normales también expresan el antígeno asociado al tumor. Por ejemplo, el CD19 es un antígeno asociado al tumor que se expresa en células B malignas. Se generaron y utilizaron CAR que contenían un anticuerpo anti-CD19 para tratar pacientes. Aunque se descubrió una remisión de las células B malignas, también se agotaron las células B normales en los pacientes debido a que las células B normales también expresan el CD19 [4]. Otro ejemplo se refiere a la anhidrasa carbónica IX (CAIX) que está sobre expresada en carcinoma renal de células claras. Se descubrió una toxicidad hepática en sujetos del primer ensayo clínico utilizando CAR que se dirigían a la CAIX, probablemente debido al hecho de que la CAIX también se expresa en las células epiteliales del conducto biliar y como tal, las células T se dirigían también al tejido normal [5].

En segundo lugar, se puede encontrar una 'actividad de CAR no regulada' en la que la rápida erradicación de las células cancerosas por los CAR induce una constelación de alteraciones metabólicas, llamada síndrome de lisis tumoral o una tormenta de citocinas, que puede ser una consecuencia fatal para los pacientes [1, 4, 6]. Este resultado es debido a que las células T transducidas que expresan CAR no pueden regularse fácilmente. Una vez que las células T transducidas se infunden en los pacientes, actualmente es muy difícil regular o controlar la activación de las células.

Por lo tanto; aunque las células T que expresan CAR presentan un gran potencial como herramientas en el tratamiento del cáncer, se necesita un sistema de CAR de próxima generación que proporcione una toxicidad fuera de diana (*off-target toxicity*) reducida y un mayor control de la activación. La presente invención se refiere a este y otros fines importantes.

55 **Breve resumen de la invención**

El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Cualquier otra divulgación de la presente descripción, independientemente de si se indica como preferida o ejemplificada, no forma parte de la presente invención. Las referencias al "método de tratamiento" en la descripción se refiere a la terapia reivindicada para su uso en dichos métodos.

La invención se refiere a un sistema de Receptor Antigénico Quimérico (CAR) y el sistema para su uso en el tratamiento de sujetos con cáncer. El sistema de CAR de la presente invención incluye linfocitos citotóxicos que expresan CAR que se dirigen a un resto que no se produce o expresa en las células del sujeto que se va a tratar. Este sistema de CAR permite por lo tanto dirigir de manera focal los linfocitos citotóxicos a las células diana, tales

5 como las células cancerosas. El resto direccionado es parte de un conjugado de moléculas pequeñas (Small Conjugate Molecule, SCM) que también comprende un ligando de un receptor de célula tumoral. La administración de una SCM junto con los linfocitos citotóxicos que expresan los CAR da como resultado el direccionamiento de la respuesta de linfocitos citotóxicos solamente contra las células que expresan el receptor tumoral al que está unido el SCM.

Las siguientes realizaciones NO son parte de la invención:

10 En una primera realización, se desvelan linfocitos citotóxicos que expresan CAR. El CAR es una proteína de fusión que comprende una región de reconocimiento, al menos un dominio de co-estimulación, y un dominio de señalización de la activación. El CAR tiene una especificidad de unión para el resto direccionado seleccionado o se puede unir a un resto direccionado.

15 En ciertos aspectos de la presente realización, la región de reconocimiento del CAR es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo con especificidad de unión para el resto direccionado. En un aspecto particular, la región de reconocimiento del CAR es un fragmento de la región variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo anti-FITC.

20 En ciertos aspectos de la presente realización, el dominio de co-estimulación del CAR se selecciona de entre el grupo que consiste en CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), y CD278 (ICOS).

En ciertos aspectos de la presente realización, el dominio de señalización de la activación del CAR es la cadena CD3ζ de la célula T o el receptor γ de Fc.

25 En ciertos aspectos de la presente invención, los linfocitos citotóxicos son uno o más de entre células T citotóxicas, células citolíticas naturales (Natural Killer, NK), y células citolíticas activadas por linfocinas (Lymphokine-Activated Killer, LAK).

30 En un aspecto particular de esta realización, la región de reconocimiento es un fragmento de la región variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo anti-FITC, el dominio de co-estimulación es CD137 (4-1BB), y el dominio de señalización de la activación es la cadena CD3ζ de célula T.

35 En ciertos aspectos de la presente realización, el resto direccionado es una molécula seleccionada de entre el grupo que consiste en 2,4-dinitrofenol (DNP), 2,4,6-trinitrofenol (TNP), biotina, digoxigenina, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), NHS-fluoresceína, éster de pentafluorofenilo (PFP), éster de tetrafluorofenilo (TFP), una knotina, una centirina y una DARPiina.

40 En ciertos aspectos de la presente realización, la especificidad de unión del CAR para el resto direccionado tiene una afinidad de al menos aproximadamente 100 pM.

En una segunda realización, se desvelan conjugados de moléculas pequeñas (SCM) que comprenden un resto direccionado conjugado con un ligando de receptor tumoral, donde el ligando del receptor tumoral es el folato.

45 Los restos direccionados que se pueden utilizar en los SCM de la invención incluyen, pero no se limitan a 2,4-dinitrofenol (DNP), 2,4,6-trinitrofenol (TNP), biotina, digoxigenina, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), NHS-fluoresceína, éster de pentafluorofenilo (PFP), éster de tetrafluorofenilo (TFP), una knotina, una centirina y una DARPiina.

50 En ciertos aspectos de la presente divulgación, el resto direccionado y el ligando se conjugan mediante un dominio enlazador. Los dominios enlazadores incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), poliprolina, un aminoácido hidrofílico, un azúcar, un peptidoglicano no natural, polivinilpirrolidona, y pluronic F-127. En un aspecto particular, el dominio enlazador es (PEG)₁₂.

55 En ciertos aspectos de la presente realización, el resto direccionado es FITC.

En ciertos aspectos de la presente realización, el resto direccionado es FITC y el enlazador es (PEG)₁₂.

En aspectos particulares de la presente realización, el SCM es FITC-folato, o FITC-(PEG)₁₂-folato.

60 Las siguientes realizaciones SON parte de la invención:

En una tercera realización, la invención se refiere a un agente terapéutico del cáncer de dos componentes que comprende:

- 65 (a) un conjugado de moléculas pequeñas (SCM) que comprende un resto direccionado conjugado con un ligando de receptor tumoral, donde el ligando del receptor tumoral es el folato; y
 (b) linfocitos citotóxicos que expresan un receptor antigénico quimérico (CAR), donde el CAR es una proteína de

fusión que comprende una región de reconocimiento, un dominio de co-estimulación y un dominio de señal de activación, y donde el CAR tiene una especificidad de unión para el resto direccionado.

5 Los restos direccionados que se pueden utilizar en los SCM incluyen, pero no se limitan a 2,4-dinitrofenol (DNP), 2,4,6-trinitrofenol (TNP), biotina, digoxigenina, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), NHS-fluoresceína, éster de pentafluorofenilo (PFP), éster de tetrafluorofenilo (TFP), una knotina, una centirina y una DARPin.

10 En ciertos aspectos de la presente divulgación, el resto direccionado y el ligando se conjugan mediante un dominio enlazador. Los dominios enlazadores incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), poliprolina, un aminoácido hidrofílico, un azúcar, un peptidoglicano no natural, polivinilpirrolidona, y pluronic F-127. En un aspecto particular, el dominio enlazador es (PEG)₁₂.

En ciertos aspectos de la presente realización, el resto direccionado es FITC.

15 En ciertos aspectos de la presente realización, el resto direccionado es FITC y el enlazador es (PEG)₁₂.

En aspectos particulares de la presente realización, el SCM es FITC-folato, o FITC-(PEG)₁₂-folato.

20 En ciertos aspectos de la presente realización, la región de reconocimiento del CAR es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo con especificidad de unión para el resto direccionado. En un aspecto particular, la región de reconocimiento del CAR es un fragmento de la región variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo anti-FITC.

25 En ciertos aspectos de la presente realización, el dominio de co-estimulación del CAR es CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), y CD278 (ICOS).

En ciertos aspectos de la presente realización, el dominio de señalización de la activación del CAR es la cadena CD3ζ de la célula T o el receptor γ de Fc.

30 En ciertos aspectos de la presente invención, los linfocitos citotóxicos son uno o más de entre células T citotóxicas, células citolíticas naturales (NK), y células citolíticas activadas por linfocinas (LAK).

35 En un aspecto particular de esta realización, la región de reconocimiento es un fragmento de la región variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo anti-FITC, el dominio de co-estimulación es CD137 (4-1BB), y el dominio de señalización de la activación es la cadena CD3ζ de célula T.

En ciertos aspectos de la presente realización, la especificidad de unión del CAR para el resto direccionado es una afinidad de al menos aproximadamente 100 pM.

40 En una cuarta realización la invención se refiere al agente terapéutico contra el cáncer de dos componentes de la invención para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un sujeto. En un primer aspecto el método comprende:

- 45 (a) el cultivo de una población de linfocitos citotóxico bajo condiciones que promuevan la activación;
 (b) la transfección de la población de linfocitos de (a) con un vector que codifica un receptor antigénico quimérico (CAR), donde el CAR es una proteína de fusión que comprende una región de reconocimiento, un dominio de co-estimulación y un dominio de señalización de la activación;
 (c) la administración de un número terapéuticamente eficaz de los linfocitos transfectados de (b) a un sujeto que tiene cáncer; y
 50 (d) la administración de un conjugado de moléculas pequeñas (SCM) que comprende un resto conjugado dirigido a un ligando de receptor tumoral al sujeto, donde el ligando es reconocido y se une por un receptor sobre la superficie de una célula del cáncer, y donde el CAR tiene una especificidad de unión por el resto direccionado o se puede unir mediante el resto direccionado;
 tratando de esta manera el cáncer en un sujeto.

55 En una realización relacionada el método comprende:

- 60 (a) el cultivo de una población de linfocitos citotóxico bajo condiciones que promuevan la activación;
 (b) la transfección de la población de linfocitos de (a) con un vector que codifica un receptor antigénico quimérico (CAR), donde el CAR es una proteína de fusión que comprende una región de reconocimiento, un dominio de co-estimulación y un dominio de señalización de la activación;
 (c) administrar un conjugado de moléculas pequeñas (SCM) que comprende un resto conjugado dirigido a un ligando de receptor tumoral a un sujeto que tiene cáncer; y en el que el ligando es reconocido y se une por un receptor sobre la superficie de una célula del cáncer; y
 65 (d) la administración de un número terapéuticamente eficaz de los linfocitos T transfectados de (b) al sujeto y donde el CAR tiene una especificidad de unión por el resto direccionado o se puede unir mediante el resto

direccionado;
tratando de esta manera el cáncer en un sujeto.

En una realización relacionada adicional el método comprende:

- 5 (a) el cultivo de una población de linfocitos citotóxicos bajo condiciones que promuevan la activación;
(b) la transfección de la población de linfocitos de (a) con un vector que codifica un receptor antigénico quimérico (CAR), donde el CAR es una proteína de fusión que comprende una región de reconocimiento, un dominio de co-estimulación y un dominio de señalización de la activación, y en el que el CAR tiene una especificidad de unión por el resto direccionado o se puede unir mediante el resto direccionado;
10 (c) incubar los linfocitos de (b) con un conjugado de moléculas pequeñas (SCM) que comprende un resto conjugado dirigido a un ligando de receptor tumoral;
(d) la administración de un número terapéuticamente eficaz de los linfocitos transfectados de (c) a un sujeto que tiene cáncer;
15 tratando de esta manera el cáncer en un sujeto.

En estas tres realizaciones relacionadas, los linfocitos citotóxicos pueden ser células autólogas o heterólogas, con respecto al sujeto que se va a tratar, o una combinación de ambas.

- 20 En estas tres realizaciones relacionadas, las condiciones de cultivo de (a) pueden comprender el cultivo de la población de linfocitos en presencia de anticuerpos anti-CD3 o anticuerpos anti-CD28, o ambos.

En ciertos aspectos de estas tres realizaciones relacionadas, la región de reconocimiento del CAR es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo con especificidad de unión para el resto direccionado. En un aspecto particular, la región de reconocimiento del CAR es un fragmento de la región variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo anti-FITC.
25

En ciertos aspectos de estas tres realizaciones relacionadas, el dominio de co-estimulación del CAR es CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), y CD278 (ICOS).
30

En ciertos aspectos de estas tres realizaciones relacionadas, el dominio de señalización de la activación del CAR es la cadena CD3ζ de la célula T o el receptor γ de Fc.

- 35 En ciertos aspectos de estas tres realizaciones relacionadas, los linfocitos citotóxicos son uno o más de entre células T citotóxicas, células citolíticas naturales (NK), y células citolíticas activadas por linfocinas (LAK).

En ciertos aspectos de estas tres realizaciones relacionadas, la región de reconocimiento es un fragmento de la región variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo anti-FITC, el dominio de co-estimulación es CD137 (4-1BB), y el dominio de señalización de la activación es la cadena CD3ζ de célula T.
40

En ciertos aspectos de estas tres realizaciones relacionadas, el resto direccionado es una molécula seleccionada de entre el grupo que consiste en 2,4-dinitrofenol (DNP), 2,4,6-trinitrofenol (TNP), biotina, digoxigenina, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), NHS-fluoresceína, éster de pentafluorofenilo (PFP), éster de tetrafluorofenilo (TFP), una knotina, una centirina y una DARPin. En un aspecto particular, el resto direccionado es FITC.
45

En dichas tres realizaciones relacionadas, el ligando es folato.

En ciertos aspectos de estas tres realizaciones relacionadas, el resto direccionado y el ligando se conjugan mediante un dominio enlazador. El dominio enlazador puede ser, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), poliprolina, un aminoácido hidrofílico, un azúcar, un peptidoglicano no natural, polivinilpirrolidona, y pluronic F-127.
50

En ciertos aspectos de estas tres realizaciones relacionadas, el resto direccionado es FITC y el enlazador es (PEG)₁₂.

- 55 En ciertos aspectos de estas tres realizaciones relacionadas, el vector es un vector lentivírico.

En ciertos aspectos de estas tres realizaciones relacionadas, la especificidad de unión del CAR por el resto direccionado es una afinidad de al menos aproximadamente 100 pM.

- 60 En ciertos aspectos de estas tres realizaciones relacionadas, el sujeto es un ser humano.

En ciertas realizaciones de estas tres realizaciones relacionadas, el cáncer es uno o más de un cáncer del cerebro, tiroides, pulmón, páncreas, riñón, estómago, estroma gastrointestinal, endometrio, mama, cuello uterino, ovario, colon, próstata, leucemias, linfomas, otros cánceres relacionados con la sangre o cáncer de cabeza y cuello.
65

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A es un esquema que presenta la construcción CAR4-1BBZ.

La Figura 1B muestra la eficacia de transducción en las células T de la construcción CAR4-1BBZ. 96 h después de la transducción, la expresión de CAR4-1BBZ se identificó por la expresión de copGFP mediante citometría de flujo. Como se muestra en la figura, aproximadamente el 30 % de las células T transfectadas expresaban CAR4-1BBZ.

La Figura 1C muestra la expresión de CAR4-1BBZ sobre las células T transducidas utilizando microscopía confocal. Se expresaba copGFP sobre las células T transducidas positivamente que contenían CAR4-1BBZ (flechas). Sin embargo, la expresión de copGFP no se detectaba sobre las células T no transducidas que no expresaban CAR4-1BBZ.

La Figura 2 muestra la microscopía confocal de la expresión de copGFP en las células T transducidas que contienen CAR4-1BBZ (fila superior) y la unión de FITC-folato en las células T transducidas con CAR-1BBZ (fila central). La fila inferior muestra la misma vista en ausencia de fluorescencia.

La Figura 3 muestra la capacidad de unión de los conjugados FITC-Folato a las células cancerosas mediante microscopía de fluorescencia. La Figura 3A muestra la unión de los conjugados FITC-Folato a las células cancerosas KB. La Figura 3B muestra la unión de los conjugados FITC-Folato a las células cancerosas L1210A. La Figura 3C muestra la unión de los conjugados FITC-(PEG)₁₂-Folato a las células cancerosas KB. La Figura 3D muestra la unión de los conjugados FITC-(PEG)₁₂-Folato a las células cancerosas L1210A. El competidor era un exceso de 50x de folato ácido.

La Figura 4 muestra los resultados de los ensayos para determinar si las células T que expresan CAR son citotóxicas para las células cancerosas en presencia o ausencia de conjugados de FITC-Folato utilizando células KB (Figura 4A) o células L1210A (Figura 4B).

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

A menos de que se señale otra cosa, los términos técnicos se utilizan de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de términos comunes en biología molecular puede encontrarse, por ejemplo, en Benjamin Lewin, Genes VII, publicado por Oxford University Press, 2000 (ISBN 019879276X); Kendrew et al. (eds.); The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Publishers, 1994 (ISBN 0632021829); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por Wiley, John & Sons, Inc., 1995 (ISBN 0471186341); y otras referencias técnicas similares.

Como se utiliza en el presente documento, "un" o "una" puede significar uno o más. Como se utiliza en el presente documento cuando se utiliza en conjunción con la palabra "que comprende", las palabras "un" o "una" puede significar uno o más de uno. Como se utiliza en el presente documento, "otro" puede significar al menos un segundo o más. Además, a menos de que se necesite otra cosa según el contexto, los términos en singular incluyen las pluralidades y los términos en plural incluyen el singular.

Como se utiliza en el presente documento, "aproximadamente" se refiere a un valor numérico, incluyendo, por ejemplo, números enteros, fracciones, y porcentajes, estén indicados explícitamente o no. El término "aproximadamente" se refiere en general a un intervalo de valores numéricos (por ejemplo, +/- un 5-10 % del valor mencionado) que un experto habituado en la técnica consideraría equivalente al valor mencionado (por ejemplo, que tiene la misma función o resultado). En algunos casos, el término "aproximadamente" puede incluir los valores numéricos que se han redondeado a la figura significativa más cercana.

Como se utiliza en el presente documento, "tratar" y todas sus formas y tiempos (incluyendo, por ejemplo, tratar, tratando, tratado y tratamiento) se refiere tanto al tratamiento terapéutico como al tratamiento profiláctico o preventivo.

II. La presente invención

La presente invención se refiere a un sistema CAR para su uso en el tratamiento de sujetos con cáncer. El sistema de CAR de la presente invención (por ejemplo, los linfocitos citotóxicos que expresan los nuevos CAR y los conjugados de moléculas pequeñas (SCM) equivalentes) utilizan los CAR que se dirigen a un resto que no se produce o expresa en las células del sujeto que se va a tratar. Este sistema de CAR permite por lo tanto dirigir de manera focal los linfocitos citotóxicos a las células diana, tales como las células cancerosas. El resto direccionado es parte de un conjugado de moléculas pequeñas (SCM) que también comprende un ligando de un receptor de célula tumoral. Debido a que normalmente se utilizan moléculas orgánicas pequeñas como resto direccionado, el aclaramiento de los SCM de la corriente sanguínea dentro de aproximadamente 20 minutos. Mediante la administración de una SCM junto con los linfocitos citotóxicos que expresan CAR, se puede direccionar la respuesta

de los linfocitos hacia solo las células que expresan el receptor tumoral, reduciendo de esta manera la toxicidad fuera de la diana, y se puede controlar más fácilmente la activación de los linfocitos debido al rápido aclaramiento del SCM. Como ventaja añadida, los linfocitos que expresan CAR se pueden utilizar como una célula citotóxica "universal" para dirigirla contra una amplia variedad de tumores sin la necesidad de preparar construcciones CAR diferentes. El resto direccionado reconocido por el CAR también se puede mantener constante. Solo es necesario alterar la parte del ligando del SCM para permitir al sistema que se dirija a las células cancerosas de identidad diferente.

Una realización de la invención proporciona una ilustración de este nuevo sistema de CAR. En esta realización, y como un primer componente, se prepara una SCM que comprende FITC unido a un ligando de un receptor celular tumoral seleccionado. Como segundo componente, se transducen las células T citotóxicas para expresar un CAR que comprende un scFv anti-FITC. Este CAR se dirige entonces al isotiocianato de fluoresceína (FITC) en vez de a un antígeno asociado al tumor que también se puede expresar por las células sanas, no dianas. Los dos componentes se administran a un sujeto que tiene cáncer y el FITC-SCM (primer componente) se une a las células tumorales diana (mediante la unión de la parte de ligando de la molécula al receptor celular tumoral equivalente). La parte FITC del SCM es reconocida y se une por el anti-FITC CAR expresado por las células T (segundo componente). Al unirse al FITC, las células T que expresan el CAR anti-FITC se activan y la célula tumoral es destruida. Como será evidente para el experto, las células T citotóxicas no pueden destruir células con la primera unión a la célula tumoral. Como será evidente adicionalmente, las células T no se unirán a las células no diana debido a que la región de reconocimiento del CAR solo reconocerá y se unirá al FITC, que no se produce o expresa por las células del sujeto. El SCM actúa por lo tanto como un puente entre las células T citotóxicas y las células tumorales diana. A condición de que el resto direccionado del SCM sea un resto que no se encuentre en el huésped, la actividad de las células T se puede limitar a las células diana. Adicionalmente, la activación de las células T que expresan CAR puede regularse limitando la cantidad de SCM administrada al sujeto, por ejemplo, manipulando la infusión del conjugado de moléculas pequeñas si se detecta un efecto secundario. Por lo tanto, el sistema de CAR de la presente invención supera los problemas asociados con la terapia de CAR convencional.

Conjugados de moléculas pequeñas (SCM)

El sistema de CAR de la presente invención utiliza conjugados de moléculas pequeñas (SCM) como puente entre los linfocitos citotóxicos y las células cancerosas direccionadas. Los SCM son conjugados que comprenden un resto direccionado sobre un extremo de la molécula y un ligando del receptor tumoral en el otro, conectados opcionalmente por un dominio puente. El resto direccionado es una molécula que es reconocida por un CAR de un linfocito transducido o que se puede unir a una región del CAR. La identidad del resto direccionado está limitada solo en que debe ser una molécula que pueda ser reconocida y unirse al CAR expresado por un linfocito; o reconocida y se une al propio CAR, en ambos casos preferentemente con una especificidad y que tenga un peso molecular relativamente bajo. Los restos direccionados ejemplares son los haptenos que pueden ser reconocidos y unirse a los CAR e incluyen moléculas orgánicas de pequeño peso molecular tales como DNP (2,4-dinitrofenol), TNP (2,4,6-trinitrofenol), biotina y digoxigenina, junto con fluoresceína y derivados de la misma, que incluyen el FITC (isotiocianato de fluoresceína), NHS-fluoresceína, y derivados del éster de pentafluorofenilo (PFP) y éster de tetrafluorofenilo (TFP). Los restos direccionados adecuados que se unen por sí mismos a una o más regiones de un CAR incluyen la knotinas [16], centirinas y DARPinas [7].

El ligando del receptor tumoral folato que está comprendido en los SCM de la presente invención es una molécula reconocida y que se une a los receptores expresados por las células tumorales diana, que se expresan normalmente en la superficie de las células tumorales. El folato es un ligando unido por el receptor de folato de las células de cánceres que incluyen los cánceres del ovario, cuello uterino, endometrio, pulmón, riñón, cerebro, mama, colon y cánceres de cabeza y cuello [10].

El resto direccionado y el ligando pueden conjugarse directamente mediante medios tales como la reacción entre el grupo isotiocianato del FITC y el grupo amina libre de los ligandos pequeños (por ejemplo, folato, DUPA y ligando CCK2R). Sin embargo, el uso de un dominio de unión para conectar las dos moléculas puede ser útil ya que puede proporcionar flexibilidad y estabilidad al SCM dependiendo de la identidad de los componentes que comprendan el SCM. Ejemplos de dominios de unión adecuados incluyen: 1) polietilenglicol (PEG); 2) poliprolina; 3) aminoácidos hidrofílicos; 4) azúcares; 5) peptidoglicanos no naturales; 6) polivinilpirrolidona; 7) pluronic F-127. Las longitudes de los enlazadores que son adecuadas incluyen, pero no se limitan a, enlazadores que tienen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40, o más átomos.

Aunque la afinidad a la que el ligando y los receptores de la célula cancerosa se unen puede variar, y en algunos casos puede ser preferible una unión de baja afinidad (tal como de aproximadamente 1 μM), la afinidad de unión de los ligandos y los receptores de la célula cancerígena será en general de al menos aproximadamente 100 μM , 1 nM, 10 nM, o 100 nM, preferentemente de al menos aproximadamente 1 pM o 10 pM, incluso más preferentemente de al menos aproximadamente 100 pM.

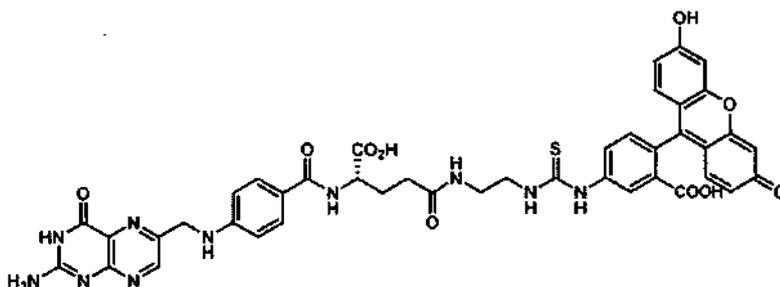
El experto entenderá y reconocerá que se pueden utilizar distintos medios para preparar los SCM comprendidos por

un resto direccionado, un dominio de unión y un ligando. Se proporcionan ejemplos en los Ejemplos incluidos en el presente documento.

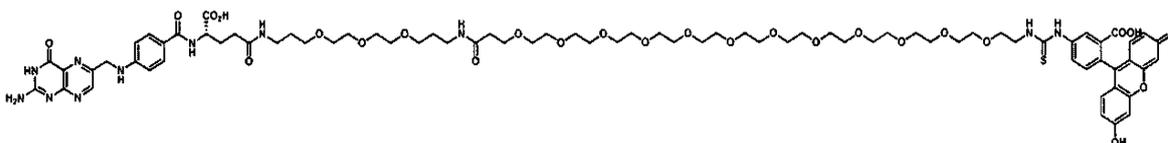
5 Antes de administrarse a un sujeto, los SCM se preparan en una formulación farmacéuticamente aceptable. Dichas formulaciones pueden contener un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptables.

Los SCM ejemplares incluidos dentro del alcance de la invención incluyen las siguientes moléculas.

10 *FITC-Folato*



FITC-(PEG)₁₂-Folato



15

Receptores antigénicos quiméricos (CAR)

20 El sistema de CAR de la presente invención también utiliza linfocitos citotóxicos modificados para que expresen los receptores antigénicos quiméricos (CAR) que reconocen y se unen al resto direccionado de los SCM. Los CAR que se utilizan en el sistema de CAR comprenden tres dominios. El primer dominio es la región de reconocimiento que, como su nombre sugiere, reconoce y se une al resto de direccionamiento. El segundo dominio es el dominio de co-estimulación, que aumenta la proliferación y supervivencia de los linfocitos. El tercer dominio es el dominio de señalización de la activación que es una señal de activación del linfocito citotóxico. Los tres dominios, juntos en forma de proteína de fusión, comprenden los CAR de la presente invención.

25

30 Como se ha sugerido anteriormente, la región de reconocimiento es la parte de un CAR que reconoce y se une al resto direccionado. Las regiones de reconocimiento que comprenden los CAR de la presente invención son fragmentos de regiones variables de cadena sencilla (scFv) de anticuerpos que se unen al resto direccionado. Preferentemente, las regiones scFv se unen al resto direccionado con especificidad. La identidad del anticuerpo utilizado en la producción de la región de reconocimiento está limitada solo en que se una al resto direccionado del SCM. Las regiones scFv se pueden preparar a partir de (i) anticuerpos conocidos en la técnica por unirse al resto direccionado, (ii) anticuerpos recientemente preparados utilizando un resto direccionado seleccionado como hapteno, y (iii) variantes de secuencia derivadas de las regiones scFv de dichos anticuerpos, por ejemplo, regiones scFv que tengan al menos un 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la región scFv de la que se derivan. El uso de anticuerpos sin alterar (es decir, de tamaño completo), tal como IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, en el CAR o como el CAR se excluyen del alcance de la invención.

35

40 El dominio de co-estimulación sirve para aumentar la proliferación y supervivencia de los linfocitos citotóxicos cuando se une el CAR a un resto direccionado. La identidad del dominio de co-estimulación está limitada solo en que tenga la capacidad de aumentar la activación de la proliferación celular y supervivencia al unirse el CAR al resto direccionado. Los dominios de co-estimulación adecuados incluyen: 1) CD28 [11]; 2) CD137 (4-1BB), un miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) [12]; 3) CD 134 (OX40), un miembro de la superfamilia de receptores TNFR [13]; 4) CD278 (ICOS), una molécula co-estimulante de la superfamilia del CD28 que se expresa sobre las células T activadas [14]. El experto entenderá que las variantes de secuencia de estos dominios de co-estimulación señalados se pueden utilizar sin que tengan un impacto adverso en la invención, cuando las variantes tienen la misma actividad o similar que el dominio sobre el que se han modelado. Dichas variantes tendrán al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del dominio del que se derivan.

45

50 En algunas realizaciones de la invención, las construcciones de CAR comprenden dos dominios co-estimulantes. Aunque las combinaciones particulares incluyen todas las variaciones posibles de los cuatro dominios señalados, los

ejemplos específicos incluyen: 1) CD28+CD137 (4-1BB) y 2) CD28+CD134 (OX40).

5 El dominio de señalización de la activación sirve para activar los linfocitos citotóxicos cuando se une el CAR a un resto direccionado. La identidad del dominio de señalización de la activación está limitada solo en que tenga la capacidad de inducir la activación del linfocito citotóxico al unirse el CAR al resto direccionado. Los dominios de señalización de la actividad adecuados incluyen la cadena CD3ζ de la célula T y el receptor γ de Fc. El experto entenderá que las variantes de secuencia de estos dominios de señalización de la activación señalados se pueden utilizar sin que tengan un impacto adverso en la invención, cuando las variantes tienen la misma actividad o similar que el dominio sobre el que se han modelado. Dichas variantes tendrán al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del dominio del que se derivan.

15 Las construcciones que codifican los CAR de la invención se preparan mediante ingeniería genética. Como ejemplo, se puede preparar un plásmido o un vector de expresión vírico que codifique una proteína de fusión que comprenda una región de reconocimiento, uno o más dominios de co-estimulación, y un dominio de señalización de la activación, en fase y unidos en dirección 5' a 3'. Sin embargo, los CAR de la presente invención no se limitan a esta disposición y se aceptan otras disposiciones que incluyen: (i) una región de reconocimiento, un dominio de señalización de la activación y uno o más dominios de co-estimulación, y (ii) una región de reconocimiento, un dominio de co-estimulación, y un dominio de señalización de la activación, unidos en dirección 5' a 3'. Se entenderá que debido a que la región de reconocimiento debe estar libre para unirse al resto direccionado, el emplazamiento de la región de reconocimiento en la proteína de fusión en general será de manera que se consiga que presente la región al exterior de la célula. De la misma manera, debido a que los dominios de co-estimulación y señalización de la activación sirven para inducir la actividad y la proliferación de los linfocitos citotóxicos, las construcciones codificarán en general una proteína de fusión que presenta estos dominios en el interior de la célula.

25 Los CAR pueden incluir elementos adicionales, tales como un péptido de señal para asegurar la exportación apropiada de la proteína de fusión a la superficie de las células, un dominio transmembrana para asegurar que la proteína de fusión se mantenga como una proteína integrante de la membrana, y un dominio de bisagra que transmita flexibilidad a la región de reconocimiento y permita una fuerte unión al resto direccionado.

30 Un ejemplo de un CAR ejemplar de la presente invención se muestra en la Figura 1A donde la proteína de fusión se codifica por un vector de expresión lentivírico y donde "SP" es un péptido de señal, el CAR es un CAR anti-FITC, está presente una bisagra CD8α, está presente un dominio transmembrana ("TM"), el dominio de co-estimulación es 4-1BB, y el dominio de señalización de la activación es CD3ζ. La secuencia del vector que codifica el CAR se proporciona como la SEQ ID NO: 1.

35 Además del uso del plásmido y vectores víricos, los linfocitos citotóxicos se pueden modificar para que expresen los CAR de la invención mediante retrovirus, lentivirus (sistema de suministro genético de CAR mediado por virus), bella durmiente, y superpuesto (sistemas de transposón/transposasa que incluyen un sistema de suministro genético de CAR mediado no víricamente).

40 Aunque la afinidad a la que los CAR, expresados por los linfocitos citotóxicos, se unen al resto direccionado puede variar, y en algunos casos puede ser preferible una unión de baja afinidad (tal como de aproximadamente 50 nM), la afinidad de unión de los CAR al ligando direccionado será en general de al menos aproximadamente 100 nM, 1 pM, o 10 pM, preferentemente de al menos aproximadamente 100 pM, 1 fM o 10 fM, incluso más preferentemente de al menos aproximadamente 100 fM.

Linfocitos citotóxicos que expresan CAR

50 Las células que se utilizan en el sistema de CAR de la presente invención son linfocitos citotóxicos seleccionados de entre (i) células T citotóxicas (también conocidas de manera distinta como linfocitos T citotóxicos, CTL, células T citotóxicas, células T citolíticas, células T CD8+, y células T citotóxicas), células citolíticas naturales (NK), células citolíticas activadas por linfocinas (LAK). Al activarse, cada uno de estos linfocitos citotóxicos desencadenan la destrucción de las células tumorales diana. Por ejemplo, las células T citotóxicas desencadenan la destrucción de células tumorales diana por uno o ambos de los siguientes medios. Primero, al activarse las células T liberan citotoxinas tales como perforina, granzimas y granulolisina. La perforina y granulolisina crean poros en la célula diana, y las granzimas entran en la célula y desencadenan una cascada de caspasa en el citoplasma que induce la apoptosis (muerte celular programada) de la célula. Segundo, la apoptosis se puede inducir mediante la interacción de ligando Fas-Fas entre las células T y las células tumorales diana.

60 Los linfocitos citotóxicos serán preferentemente células autólogas, aunque también se pueden utilizar células heterólogas, tales como cuando el sujeto que se va a tratar utilizando el sistema de CAR de la invención ha recibido quimioterapia de altas dosis o tratamiento de radiación para destruir el sistema inmunitario del sujeto. En dichas circunstancias, se pueden utilizar células alogénas.

65 Los linfocitos citotóxicos se pueden aislar de la sangre periférica utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, que incluyen centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll seguido por una selección negativa para retirar las

células no deseadas.

- Los linfocitos citotóxicos se pueden modificar para que expresen construcciones CAR transfectando una población de linfocitos con un vector de expresión que codifique la construcción de CAR. Los medios apropiados para la preparación de una población de linfocitos transducida que expresen una construcción de CAR seleccionada serán bien conocidos por el experto en la técnica, e incluyen retrovirus, lentivirus (sistema de suministro genético de CAR mediado por virus), bella durmiente, y superpuesto (sistemas de transposón/transposasa que incluyen un sistema de suministro genético de CAR mediado no víricamente), por nombrar algunos ejemplos.
- Los linfocitos citotóxicos transducidos se cultivan bajo condiciones que sean adecuadas para que se introduzca una población de células en un sujeto tal como un ser humano. Las consideraciones específicas incluyen el uso de medios de cultivo que carezcan de productos animales, tales como el suero bovino. Otras consideraciones incluyen la condición de esterilización para evitar la contaminación con bacterias, hongos y micoplasmas.
- Antes de que se administre a un sujeto, las células se aglomeran, se lavan y se resuspenden en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones ejemplares que comprenden linfocitos citotóxicos que expresan CAR incluyen formulaciones que comprenden las células en solución salina estéril de 290 mOsm, un criomedio infundible (que contenga Plasma-Lyte A, dextrosa, cloruro sódico para inyección, seroalbúmina humana y DMSO), un 0,9 % de NaCl con un 2 % de seroalbúmina humana o cualquiera de otros materiales infundibles estériles de 290 mOsm.

Métodos de tratamiento

- El sistema de CAR de la presente invención se puede utilizar en el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer. El sistema de CAR para su uso en los métodos de tratamiento englobados por la invención incluye en general las etapas de (i) obtención de una población de linfocitos citotóxicos autólogos o heterólogos, (ii) el cultivo de los linfocitos bajo condiciones que promuevan la activación de las células, (iii) la transfección de los linfocitos con un vector de expresión que codifique un CAR, (iv) la administración de una formulación que comprende los linfocitos transfectados a un sujeto que tiene cáncer, y (v) la administración de una formulación que comprende una SCM al sujeto.

- La invención también incluye variaciones de este tema tal como la administración de la formulación que comprende el SCM al sujeto antes de la formulación que comprenden los linfocitos transfectados, o al mismo tiempo que la formulación que comprende los linfocitos transfectados. Una variación adicional incluye el cultivo de la formulación que comprende los linfocitos transfectados con el SCM antes de la administración al sujeto.

- La población de linfocitos citotóxicos se puede obtener de un sujeto por medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células T citotóxicas se pueden obtener recolectando sangre periférica del sujeto, sometiendo la sangre a una centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll, y luego utilizando un kit de aislamiento de células T negativo (tal como el kit EasySep™ T Cell Isolation) para aislar una población de células T citotóxicas de la sangre. Aunque la población de linfocitos citotóxicos no tiene que ser pura y puede contener otras células sanguíneas tales como células T, monocitos, macrófagos, células citolíticas naturales y células B, dependiendo de la población que se recolecte, preferentemente, la población comprende al menos aproximadamente un 90 % del tipo celular seleccionado. En aspectos particulares, la población comprende al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o incluso un 100 % del tipo celular seleccionado. Como se ha indicado anteriormente, la población de células puede venir del sujeto que se va a tratar, de uno o más sujetos diferentes, o la población puede ser una combinación de células del sujeto que se va a tratar y de uno o más sujetos diferentes.

- Después de obtener la población de linfocitos citotóxicos, las células se cultivan bajo condiciones que promuevan la activación de las células. Las condiciones de cultivo serán de manera que las células se puedan administrar a un sujeto sin problemas de reactividad contra los componentes del cultivo. Por ejemplo, cuando se administre la población a un ser humano, las condiciones de cultivo no incluirán productos de suero bovino, tal como seroalbúmina bovina. La activación de los linfocitos en el cultivo se puede conseguir introduciendo activadores conocidos en el cultivo tales como anticuerpos anti-CD3 en el caso de las células T citotóxicas. Otros activadores adecuados incluyen los anticuerpos anti-CD28. La población de linfocitos se cultivará en general bajo condiciones que promuevan la activación durante aproximadamente 1 a 4 días. El nivel apropiado de activación celular se puede determinar por el tamaño celular, tasa de proliferación o marcadores de activación mediante citometría de flujo.

- Después de cultivarse la población de linfocitos citotóxicos bajo condiciones que promuevan la activación, las células se transfectan con un vector de expresión que codifique un CAR. Dichos vectores se han descrito anteriormente, junto con medios adecuados de transfección. Después de la transfección, la población de células resultante se puede administrar inmediatamente a un sujeto o las células se pueden cultivar durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o más días, o entre aproximadamente 5 y 12 días, entre aproximadamente 6 y 13 días, entre aproximadamente 7 y 14 días, o entre aproximadamente 8 y 15 días, por ejemplo, de tiempo para permitir que las células se recuperen de la transfección. Las condiciones de cultivo adecuadas serán las mismas que las condiciones en las que se cultivaron mientras se promovía la activación, sea

con o sin el agente que se utilizó para promover la activación y la expansión.

5 Cuando las células transfectadas están listas, se prepara una formulación que comprende las células y se administra a un sujeto que tenga un cáncer. Antes de la administración, se puede lavar y resuspender la población de células en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptables para formar la formulación. Dichos vehículos y diluyentes incluyen, pero no se limitan a, solución salina estéril de 290 mOsm, un criomedio infundible (que contenga Plasma-Lyte A, dextrosa, cloruro sódico para inyección, seroalbúmina humana y DMSO), un 0,9 % de NaCl con un 2 % de seroalbúmina humana o cualquiera de otros materiales infundibles estériles de 290 mOsm. De manera alternativa, dependiendo de la identidad del medio de cultivo utilizado en la etapa previa, las células se pueden administrar en el medio de cultivo como formulación, o se concentran y resuspenden en el medio de cultivo antes de la administración. La formulación se puede administrar al sujeto mediante un medio adecuado, tal como la administración parenteral, por ejemplo, por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, o intratecal.

15 El número total de células y la concentración de las células en la formulación que se administra a un sujeto variará dependiendo de varios factores incluyendo el tipo de linfocitos citotóxicos que se va a utilizar, la especificidad de unión del CAR, la identidad del resto direccionado y el ligando, la identidad del cáncer o tumor que se va a tratar, la localización en el sujeto del cáncer o tumor, el medio utilizado para administrar las formulaciones al sujeto, y la salud, edad, y peso del sujeto que se va a tratar. Sin embargo, las formulaciones adecuadas que comprenden linfocitos transducidos incluyen los que tienen un volumen de entre aproximadamente 5 ml y 200 ml, que contienen desde aproximadamente 1×10^5 a 1×10^{15} células transducidas. Las formulaciones típicas comprenden un volumen de entre aproximadamente 10 ml y 125 ml que contiene desde aproximadamente 1×10^7 a 1×10^{10} células transducidas. Una formulación ejemplar comprende aproximadamente 1×10^9 células transducidas en un volumen de aproximadamente 100 ml.

25 La etapa final en el método es la administración de una formulación que comprende una SCM al sujeto. Como se ha descrito anteriormente, el SCM se preparará en una formulación apropiada para el sujeto que recibe las moléculas. La concentración de SCM en una formulación de SCM variará dependiendo de factores que incluyen la especificidad de unión del CAR, la identidad del resto direccionado y el ligando, la identidad del cáncer o tumor que se va a tratar, la localización en el sujeto del cáncer o tumor, el medio utilizado para administrar las formulaciones al sujeto, y la salud, edad, y peso del sujeto que se va a tratar. Sin embargo, las formulaciones adecuadas que comprenden SCM incluyen las que tienen un volumen de entre aproximadamente 1 ml y 50 ml y que contienen entre aproximadamente 20 ug/kg de peso corporal y 3 mg/kg de peso corporal de SCM. Las formulaciones típicas comprenden un volumen de entre aproximadamente 5 ml y 20 ml y contienen entre aproximadamente 0,2 mg/kg de peso corporal y 0,4 mg/kg de peso corporal de SCM. Una formulación ejemplar comprende aproximadamente 50 ug/kg de peso corporal de SCM en volumen de aproximadamente 10 ml.

40 El tiempo entre la administración de la formulación de linfocitos transducidos y la formulación de SCM variará dependiendo de factores que incluyen el tipo de linfocitos citotóxicos que se va a utilizar, la especificidad de unión del CAR, la identidad del resto direccionado y el ligando, la identidad del cáncer o tumor que se va a tratar, la localización en el sujeto del cáncer o tumor, el medio utilizado para administrar las formulaciones al sujeto, y la salud, edad, y peso del sujeto que se va a tratar. Además, la formulación de SCM se puede administrar antes, simultáneamente, o después de la formulación de linfocitos. En general, la formulación de SCM se administrará después de la formulación de linfocitos, tal como dentro de 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, o 24 horas, o dentro de 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más días. Cuando se administra la formulación de SCM antes de la formulación de linfocitos, la formulación de linfocitos se administrará en general dentro de 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más horas. Cuando la formación de SCM y la formulación de linfocitos se añaden simultáneamente, es preferible que las formulaciones no se combinen y por lo tanto se administren por separado al sujeto.

50 Dependiendo del cáncer que se va a tratar la etapa de administración de la formulación de linfocitos, o la etapa de administración de la formulación de SCM, o ambas se puede repetir una o más veces. El número y orden particulares de las etapas están limitados ya que el médico encargado puede encontrar que un método se puede practicar para la ventaja del sujeto utilizando uno o más de las siguientes metodologías, u otras no mencionadas aquí: (i) la administración de formulación de linfocitos (A) seguida por la formulación de SCM (B), es decir, A luego B; (ii) B luego A; (iii) A luego B, luego A, luego B; (iv) A luego B, luego A; (v) B luego A, luego B, luego A; (vi) A luego A, luego B; (vii) B luego A, luego A; (viii) B luego B, luego A.

60 Las formulaciones se pueden administrar como dosis únicas continuas, o se pueden dividir y administrarse como un régimen de dosis múltiples dependiendo de la reacción (es decir, efectos secundarios) del paciente a las formulaciones.

65 Los tipos de cánceres que se pueden tratar utilizando los métodos de la invención se gobernarán basándose en la identidad del ligando utilizado en el SCM. Cuando se utiliza el ligando definido anteriormente (es decir, el folato) los cánceres que se pueden tratar utilizando el sistema de CAR y los métodos de la presente invención incluyen en general tumores sólidos, y más específicamente incluyen el adenocarcinoma canceroso de próstata, hepatoma, metástasis hepática de cáncer colorrectal, y cánceres de origen neuroendocrino.

En cada una de las realizaciones y aspectos de la invención, el sujeto es un ser humano, un primate no humano, un ave, caballo, vaca, cabra, oveja, animal de compañía, tal como un perro, gato o roedor, u otro mamífero.

5 III. Ejemplos

1. Generación de CAR4-1BBZ y transducción de células T de ratón para que expresen CAR

10 Para generar células T modificadas que contengan CAR que se dirijan a las células cancerosas mediante conjugados de molécula pequeña FITC-ligando, se diseñaron construcciones CAR y se generaron como se muestra en la Figura 1.

A) Generación del receptor antigénico quimérico (CAR) en un vector lentivírico

15 Se utilizó un método de PCR solapada para generar construcciones CAR que comprenden un scFv contra FIT (CAR4-1BBZ). Se sintetizó el scFv contra FITC 4M5.3 (Kd = 270 fM, 762 pb) derivado del anticuerpo anti-fluorescencia (4-4-20), basándose en un informe previo [15]. Como se muestra en la Figura 1, la secuencia que codifica el péptido de señal CD8 α de ratón (SP, 81 pb), la región de bisagra y transmembrana (207 pb), el dominio citoplásmico de 4-1BB (CD137, 144 pb) y la cadena CD3 ζ (339 pb) se fusionaron con el scFv anti-FITC mediante
20 PCR de solapamiento. La construcción CAR resultante (CAR4-1BBZ) (1533 pb; SEQ ID NO: 2) se insertó en el vector de expresión lentivírico escindido por NheI/NotI pCDH-EFI-MCS-BGH-PGK-GFP-T2A-Puro (System Biosciences, Mountain View, CA). La expresión de CAR4-1BBZ se regula mediante un promotor EF1 α en el vector lentivírico. La secuencia de las construcciones CAR en el vector lentivírico (CAR4-1BBZ) se confirmó por secuenciación de ADN (en la Purdue Genomic Core Facility) y se proporciona en la SEQ ID NO: 1. Se controló la
25 expresión de copGFP codificada en el vector lentivírico para identificar la expresión de CAR-1BBZ (Figura 1C).

B) Aislamiento y transducción de células T de ratón

30 Las células T se aislaron del bazo de ratón o la sangre periférica. Para aislar las células T, se aislaron los esplenocitos de ratón y las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll (GE Healthcare Lifesciences). Después de retirar por lavado la solución de Ficoll, las células T se aislaron con el kit EasySep™ Mouse T Cell Isolation (STEM CELL technologies). Las células T purificadas se cultivaron en RPMI 1640 con un 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS), un 1 % de penicilina y sulfato de estreptomina, 10 mM de HEPES. Para preparar el virus lentivírico CAR-1BBZ, se
35 cotransfectó la línea celular de empaquetamiento 293TN con el vector lentivírico CAR-1BBZ y los plásmidos de empaquetamiento. Después de 48 y 72 horas de la transfección, se recolectaron los sobrenadantes que contenían los lentivirus CAR4-1BBZ y se concentraron las partículas víricas para la transducción. Para la transducción de las células T de ratón, las células T aisladas se activaron con Dynabeads acopladas con anticuerpos anti-CD3 / CD28 (Life Technologies) durante 12-24 horas en presencia de IL-2 de ratón (50 unidades/ml), y luego se infectaron con el
40 vector de expresión lentivírico que contenía CAR4-1BBZ. La IL-2 de ratón (50 unidades/ml) se proporcionó día sí día no. Después de 96 horas, se recolectaron las células y la expresión de CAR en las células T transducidas se identificó mediante citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 1B, aproximadamente el 30 % de las células T transfectadas expresaban CAR4-1BBZ.

45 C) Citometría de flujo

La expresión de CAR4-1BBZ en las células T transducidas se determinó mediante citometría de flujo. Como el
armazón de expresión lentivírica también codifica la expresión de copGFP, se verificaron las células T transducidas con CAR4-1BBZ mediante la expresión de copGFP. La Figura 1C muestra la expresión de CAR4-1BBZ en las
50 células T transducidas. Las células T transducidas se confirmaron adicionalmente mediante microscopía confocal. La copGFP se expresaba en las células T transducidas que contenían CAR4-1BBZ (flechas). Sin embargo, la expresión de copGFP no se detectaba sobre las células T no transducidas que no expresaban CAR4-1BBZ. Los datos se analizaron con el software FlowJo.

55 Basándose en estos resultados, era evidente que las construcciones CAR4-1BBZ se transdujeron satisfactoriamente en las células T de ratón y que las células T transducidas expresan CAR4-1BBZ.

D) Cultivo celular

60 Se utilizaron dos líneas celulares de cáncer en este estudio: L1210A y KB. L1210A es una línea celular de leucemia murina. KB es una línea celular de un carcinoma epidermoide humano. Ambas tienen una expresión del receptor de folato mayor en la superficie celular.

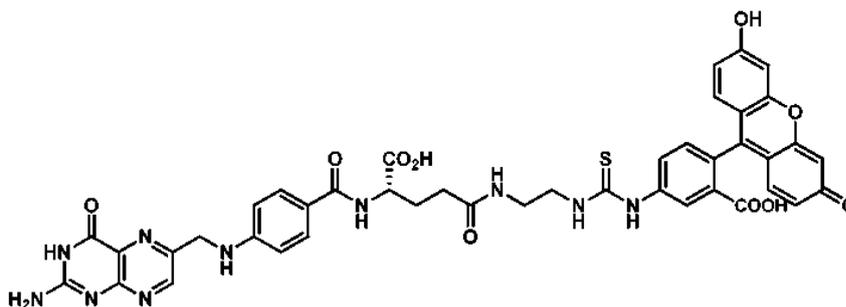
65 Las células L1210A y KB se cultivaron en un medio RPMI deficiente en ácido fólico, se incluyeron en el medio de cultivo un 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS), un 1 % de penicilina y sulfato de estreptomina.

2. Generación del conjugado de moléculas pequeñas que comprende FITC y ligandos

A) Síntesis de FITC-Folato

- 5 El Folato-y-etilendiamina se acopló con el isómero I de FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en dimetilsulfóxido anhidro en presencia de tetrametilguanidina y diisopropilamina. El producto en bruto se cargó en una columna de HPLC preparativa Xterra RP18 (Waters) y se eluyó con condiciones de gradiente que se inician con un 99 % de fosfato sódico 5 mM (fase móvil A, pH 7,4) y un 1 % de acetonitrilo (fase móvil B) y alcanzaba un 90 % de A y un 10 % de B en 10 min con un caudal de 20 ml/min. En estas condiciones, el pico principal de FITC-folato normalmente se eluía a los 27-50 min. La calidad de la fracción folato-FITC se controló mediante HPLC de fase inversa analítica con un detector de UV. Las fracciones con más de un 98,0 % de pureza (LCMS) se liofilizaron para obtener el producto final de folato-FITC.

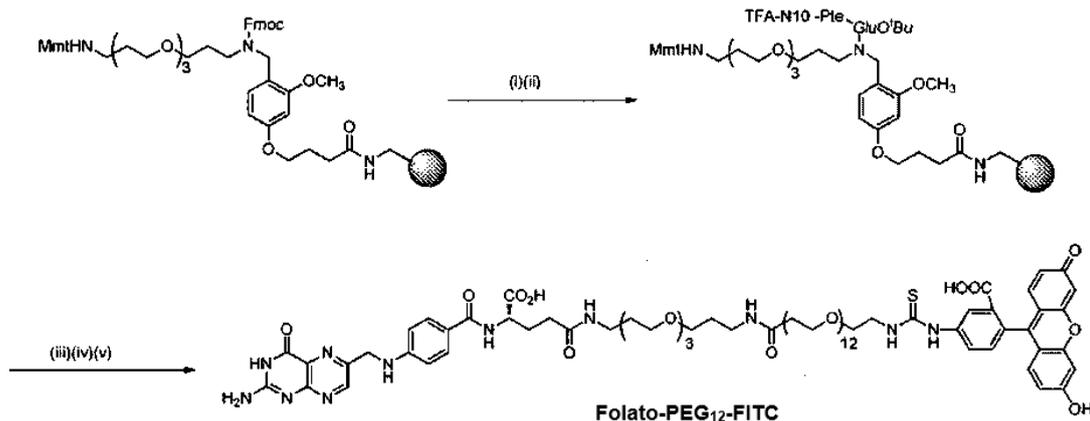
FITC-Folato

15 B) Síntesis de FITC-(PEG)₁₂-Folato

- Se cargó la resina Universal PEG Nova Tag™ (0,2 g) en un vaso de síntesis de péptidos y se lavó con *i*-PrOH (3 x 10 ml), seguido por DMF (3 x 10 ml). La desprotección de Fmoc se llevó a cabo utilizando un 20 % de piperidina en DMF (3 x 10 ml). Se llevaron a cabo los ensayos de Kaiser para evaluar la terminación de la reacción. Se introdujo entonces en el vaso una solución de Fmoc-Glu-(O-*t*-Bu)-OH (23,5 mg) en DMF, *i*-Pr₂NEt (4 equiv), y PyBOP (2 equiv). La desprotección de Fmoc se llevó a cabo utilizando un 20 % de piperidina en DMF (3 x 10 ml). Se introdujo entonces en el vaso una solución de N10-TFA-Pte-OH (22,5 mg), DMF, *i*-Pr₂NEt (4 equiv), y PyBOP (2 equiv). Se burbujeó el argón durante 2 h, y se lavó la resina con DMF (3 x 3 ml) e *i*-PrOH (3 x 3 ml). Después de hinchar la resina en DCM, se añadió una solución de 1 M de HOBT en DCM/TFE (1:1) (2 x 3 ml) para retirar el grupo Mmt. Se burbujeó el argón durante 1 h, se retiró el disolvente y se lavó la resina con DMF (3 x 3 ml) e *i*-PrOH (3 x 3 ml). Después de hinchar la resina en DMF, se añadió una solución de Fmoc-NH-(PEG)₁₂-COOH (46,3 mg) en DMF, *i*-Pr₂NEt (4 equiv), y PyBOP (2 equiv). Se burbujeó el argón durante 2 h, y se lavó la resina con DMF (3 x 3 ml) e *i*-PrOH (3 x 3 ml). La desprotección de Fmoc se llevó a cabo utilizando un 20 % de piperidina en DMF (3 x 10 ml). Se llevaron a cabo los ensayos de Kaiser para evaluar la terminación de la reacción. Se introdujo entonces en el vaso una solución de FITC (21,4 mg) en DMF, *i*-Pr₂NEt (4 equiv), entonces se burbujeó el argón durante 2 h, y se lavó la resina con DMF (3 x 3 ml) e *i*-PrOH (3 x 3 ml). Entonces se añadió en el vaso un 2 % de NH₂NH₂ en DMF (2 x 2 ml). El compuesto final se escindió de la resina utilizando un TFA:H₂O: TIS (95:2,5:2,5) y se concentró al vacío. El producto concentrado se precipitó en Et₂O y se secó al vacío. El producto en bruto se purificó utilizando una RP-HPLC preparativa (fase móvil: A = 10 mM de acetato amónico pH = 7, B = ACN; método: 0 % de B a 30 % de B en 30 min a 13 ml/min). Las fracciones puras se agruparon y se secaron por congelación, suministrando el FITC-(PEG)₁₂-Folato.

ESQUEMA 1. Síntesis de unidad espaciadora del Folato-(PEG)₁₂-FITC:

40



Reactivos y condiciones: (i) a) un 20 % de piperidina, DMF; b) Fmoc-NH-Glu(O^tBu)-COOH, PyBOP, DIPEA, DMF; (ii) a) un 20 % de piperidina, DMF; b) ácido N¹⁰-(Trifluoroacetil) ptericoico, PyBOP, DIPEA, DMF; (iii) a) 1 M de HOBT en DCMTFE (1:1); b) Fmoc-NH-PEG₁₂CH₂CH₂COOH, PyBOP, DIPEA, DMF; (iv) a) un 20 % de piperidina, DMF; b) FITC, DIPEA, DMF; (v) a) un 2 % de NH₂NH₂, DMF; b) TFA, agua, *i*-Pr₃SiH.

3. Unión de conjugados FITC-Folato y FITC-(PEG)₁₂-Folato a las células T transducidas mediante el scFv anti-FITC en CAR4-1BBZ

10 Para examinar la capacidad de las células T transducidas que contienen CAR4-1BBZ para unirse a los conjugados de FITC-Folato, se llevaron a cabo ensayos de unión con el conjugado FITC-Folato y el conjugado FITC-(PEG)₁₂-Folato. Como la longitud de onda de excitación del FITC en los conjugados de FITC-Folato se solapaban con copGFP en las células T transducidas con CAR4-1BBZ, era difícil distinguir entre la unión con FITC y la expresión de copGFP. Por lo tanto, se utilizaron un anticuerpo monoclonal anti-folato ácido (FA) y un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con un fluoróforo (con una excitación de 640 nm).

15 Primero, se incubaron las células T transducidas con los conjugados FITC-Folato y FITC-(PEG)₁₂-Folato a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de un lavado con PBS 1x, las células T transducidas se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-FA (con una dilución 1:15) durante 1 hora. Después de otro lavado con PBS 1x, las células T transducidas se incubaron adicionalmente con el anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con un fluoróforo (con una excitación de 640 nm) (con una dilución de 1:50). Finalmente, los anticuerpos no unidos se retiraron mediante lavado y se utilizó un microscopio confocal para confirmar la capacidad de unión de los conjugados FITC-Folato y FITC-(PEG)₁₂-Folato. Todos los datos se analizaron con el software Olympus Fluoview . Como se muestra en la Figura 2, la expresión de copGFP se observaba en las células T transducidas que contenían CAR4-1BBZ (fila superior), pero no en las células T no transducidas. Como se muestra en el panel del medio se observaba una unión de FITC-Folato en las células T transducidas con CAR-1BBZ, pero no en las células T no transducidas. De manera más importante, solo las células T transducidas que presentaban expresión de copGFP (fila superior) también presentaban unión con los conjugados FITC-Folato (fila del medio). Mediante microscopía confocal, se confirmó que los conjugados FITC-Folato y FITC-(PEG)₁₂-Folato se unían satisfactoriamente al anti-FITC de las células T transducidas, pero no de las células T no transducidas. De manera simultánea, también se detectó la unión de los conjugados FITC-Folato y FITC-(PEG)₁₂-Folato (flechas) en las células T transducidas con CAR4-1BBZ. Basándose en estos datos, se concluyó que las células T transducidas expresan CAR4-1BBZ y que los conjugados de FITC-Folato se pueden unir a las células T transducidas mediante el scFv anti-FITC expresado por la transducción de CAR4-1BBZ.

4. La unión de conjugados de FITC-Folato a células cancerosas positivas a FR

40 Se investigó a continuación la capacidad de los conjugados FITC-Folato y FITC-(PEG)₁₂-Folato para unirse a las células cancerosas positivas al receptor de folato (FR). Se utilizaron las líneas celulares positivas a FR L1210A (leucemia linfocítica de ratón) y KB (carcinoma epidérmico de la boca) que son líneas celulares positivas a FR, para ensayar la afinidad de unión de los conjugados FITC-Folato. En resumen, se prepararon 3-4 x 10⁴ células cancerosas para llevar a cabo los ensayos de afinidad de unión con los conjugados FITC-Folato y FITC-(PEG)₁₂-Folato. Se incubaron los dos conjugados de FITC-Folato con dos concentraciones diferentes (por ejemplo, 20 nM, 70 nM), con células cancerosas a temperatura ambiente durante 1 hora. Como ambos conjugados FITC-Folato tienen fluorescencia, se puede detectar la capacidad de unión de los conjugados FITC-Folato a las células cancerosas mediante microscopía de fluorescencia. Después de dos lavados con solución salina tampón de fosfato (PBS) 1x para retirar todos los compuestos no unidos, las células cancerosas se observaron mediante microscopio confocal. En el fin de especificar si los conjugados FITC-Folato se unían a las células cancerosas mediante el FR en la superficie de las células cancerosas, también se incubó un Folato ácido con las células cancerosas como compuesto de competición. Como se muestra en las Figuras 3A, B, C y D, los conjugados de FITC-Folato se pueden unir a ambas células cancerosas (KB, L1210A) mediante el FR de la superficie celular. Como se muestra en el panel de competición, la adición de un exceso de 50x de folato ácido bloqueaba la unión de FITC-Folato a estas células cancerosas, lo que indica que la unión específica es entre el folato ácido y el FR de la superficie celular.

55 Como se muestra en la Figura 3A el conjugado FITC-Folato se internalizaba en el citoplasma celular de las células KB, a causa de endocitosis mediada por el FR. Sin embargo, como se muestra en la Figura 3C, el conjugado FITC-(PEG)₁₂-Folato que tiene el enlazador (PEG)₁₂ entre el Folato y el FITC, se mantenía en la superficie extracelular de las células KB.

60 A partir de estos datos se concluyó que los conjugados FITC-Folato y FITC-(PEG)₁₂-Folato se podían unir a las células cancerosas mediante el FR de la superficie de las células cancerosas. Se descubrió también que el enlazador PEG entre el Folato y el FITC podía impedir la internalización del conjugado de FITC-Folato. La localización en la superficie del conjugado FITC-Folato ayudaría a aumentar la oportunidad de que las células cancerosas sean reconocidas por las células T transducidas que contengan CAR4-1BBZ. Si los conjugados FITC-Folato se internalizan mediante endocitosis mediada por el FR, las células T transducidas no pueden direccionarse a las células cancerosas mediante los conjugados de FITC-Folato.

5. Citotoxicidad de las células T modificadas con CAR anti-FITC contra las células cancerosas positivas al receptor de folato (FR+)

- 5 Con el fin de explorar si las células T que expresan CAR pueden destruir las células cancerosas, se llevaron a cabo ensayos de liberación de ^{51}Cr . En este ensayo, las células cancerosas se marcaron con ^{51}Cr . Cuando las células cancerosas se lisaban, el ^{51}Cr se liberaría de las células cancerosas al sobrenadante. Midiendo el ^{51}Cr del sobrenadante, se puede determinar el número de células cancerosas destruidas.
- 10 En primer lugar, se incubaron las células cancerosas diana L1210A en 50 μl de medio de cultivo que contenía 50 μCi de ^{51}Cr para marcarlas. Después de un lavado x3 con PBS se resuspendieron las células L1210A y se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora en el medio de cultivo que contenía 70 nM de conjugado FITC-Folato o el conjugado FITC-(PEG) $_{12}$ -Folato. Después de retirar mediante lavado el exceso de conjugados de FITC, se añadieron 5 x 10³ células cancerosas diana en cada pocillo de placas de 96 pocillos. Cuando se utilizaron células KB adherentes como diana, se trataron de manera similar a las células L1210A, excepto que las células KB se cultivaron en placas de 96 pocillos durante 24 horas antes de marcarlas con el ^{51}Cr y se llevó a cabo la unión con los conjugados FITC-Folato en placas de 96 pocillos. Las células T efectoras se recolectaron entonces, se resuspendieron en medio de cultivo y se añadieron a los pocillos que contenían las células cancerosas diana. La relación entre células T efectoras respecto a células cancerosas diana era de 20:1. Después de una incubación durante 4-10 horas, se recolectaron alícuotas de 20 μl de sobrenadante libre de células y se midió el ^{51}Cr de los sobrenadantes en un contador de centelleo o un contador γ .

El porcentaje de citólisis específica se calculó utilizando la siguiente fórmula: % de citólisis = (liberación de ^{51}Cr experimental - liberación de ^{51}Cr de control) / (Máxima liberación de ^{51}Cr - liberación de ^{51}Cr de control) x 100

- 25 Los pocillos de control contenían solo las células cancerosas diana; no se añadieron nunca células T efectoras a estos pocillos. La máxima liberación de ^{51}Cr se determinó midiendo la liberación de ^{51}Cr de las células diana marcadas tratadas con un 2,5 % de SDS para lisar todas las células.
- 30 Como se muestra en la Figura 4A, en ausencia de conjugados FITC-Folato, las células T que expresan CAR presentaban una actividad insignificante (~5 %) de citólisis celular de las KB diana. En presencia del conjugado de FITC-Folato, las células T que expresaban CAR presentaban ~18 % de citólisis de células cancerosas. Esto implicaba que el conjugado FITC-Folato actúa como un puente para redirigir las células T que expresan CAR anti-FITC a las células KB FR+. Además, en presencia del conjugado FITC-(PEG) $_{12}$ -Folato, que tiene un espaciador de (PEG) $_{12}$ de ~40 Å entre las moléculas de FITC y Folato, las células T que expresaban CAR anti-FITC presentaban una actividad mucho más alta (~39 %) sobre la citólisis de las células cancerosas. Con una distancia de ~40 Å entre el FITC y el Folato este conjugado puede redirigir las células T que expresan CAR a las células KB FR+ mucho mejor (un 39 % vs un 18 %). Como control de citotoxicidad no específico, las células T no modificadas presentaban solo un 5-10 % de citólisis. La existencia o ausencia de los conjugados de FITC-Folato no presentan ningún efecto sobre la citotoxicidad de las células T no modificadas contra las células KB FR+.

- La Figura 4B muestra la citotoxicidad de las células T modificadas con CAR anti-FITC contra la línea de células cancerosas L1210A. En ausencia de conjugados de FITC-Folato, las células T que expresan CAR presentaban una actividad insignificante (2-3 %) de citólisis celular de las L1210A diana. En presencia del conjugado de FITC-Folato, las células T que expresaban CAR presentaban ~29 % de citólisis de células cancerosas. Esto implicaba que el conjugado FITC-Folato actúa como un puente para redirigir las células T que expresan CAR anti-FITC a las células L1210A FR+. Además, en presencia del conjugado FITC-(PEG) $_{12}$ -Folato, que tiene un espaciador de (PEG) $_{12}$ de ~40 Å entre las moléculas de FITC y Folato, las células T que expresaban CAR anti-FITC presentaban una actividad mucho más alta (~51 %) sobre la citólisis de L1210A FR+. Con una distancia de ~40 Å entre el FITC y el Folato este conjugado puede redirigir las células T que expresan CAR a las células L1210A FR+ mucho mejor (un 51 % vs un 29 %). Como control de citotoxicidad no específico, las células T no modificadas presentaban solo un 5-10 % de citólisis como se esperaba.

- A partir de estos datos se concluyó que las células T que expresan CAR anti-FITC no tienen una citotoxicidad innata contar las células cancerosas FR+. Sin embargo, en presencia del conjugado de FITC-Folato, las células T que expresan CAR anti-FITC se redirigen a las células cancerosas FR+ y producen citólisis específica, y la activación de las células T que expresan CAR se puede regular controlando la adición de conjugados de FITC-Folato. Adicionalmente, el conjugado de FITC-(PEG) $_{12}$ -Folato, que tienen un espaciador de ~40 Å entre las moléculas de FITC y de Folato, puede redirigir las células T que expresan CAR anti-FITC hacia las células cancerosas FR+ mucho mejor que el conjugado sin el espaciador.

Referencias

- 65 Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la presente memoria descriptiva son indicativas del nivel de experiencia de los expertos en la técnica a la que pertenece la invención. Todas las referencias siguientes se han citado en la presente solicitud:

1. Sadelain, M. et al., The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discovery*. 2013. 3(4):388-98.
- 5 2. Cartellieri, M. et al., Chimeric antigen receptor-engineered T cells for immunotherapy of cancer. *J Biomedicine and Biotechnology*. 2010. Article ID 956304, 13 pages.
3. Urba, W.J. et al, Redirecting T cells. *N Engl J Med*. 2011. 365:8.
4. Porter, D.L. et al., Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2011. 365:725-33.
- 10 5. Cor, H.J. et al., Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma With Autologous T-Lymphocytes Genetically Retargeted Against Carbonic Anhydrase IX: First Clinical Experience. *J Clin Oncol*. 2006. 24(13):e20-2.
6. Kochenderfer, J.N. et al., B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in clinical trial of anti-CD 19 chimeric antigen receptor transduced T cells. *Blood*. 2012. 119(12):2790-20.
7. Reichert, J.M. Day 1, Emerging Disruptive Technologies and Cutting-Edge Analytical Techniques. *MAbs* 2009. 1(3): 190-209.
- 15 8. Kularatne, S.A. et al., Pro state-specific membrane antigen targeted imaging and therapy of prostate cancer using a PSMA inhibitor as a homing ligand. *Mol Pharm*. 2009. 6(3):780-9.
9. Wayua. C. et al., Evaluation of a Cholecystokinin 2 Receptor-Targeted Near-Infrared Dye for Fluorescence-Guided Surgery of Cancer. *Molecular Pharmaceutics*. 2013. (ePublication).
- 20 10. Segal, E.I. et al., Tumor detection using folate receptor-targeted imaging agents. *Cancer-Metastasis Rev*. 2008. 27(4):655-64.
11. Alvarez-Vallina, L. et al., Antigen-specific targeting of CD28-mediated T cell co-stimulation using chimeric single-chain antibody variable fragment-CD28 receptors. *Eur J Immunol*. 1996. 26(10):2304-9.
12. Imai, C. et al., Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2004. 18:676-84.
- 25 13. Latza, U. et al., The human OX40 homolog: cDNA structure expression and chromosomal assignment of the ACT35 antigen. *Eur. J. Immunol*. 1994. 24:677.
14. Hutloff, A. et al., ICOS is an inducible T-cell costimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*. 1999. 397:263.
- 30 15. Orr, B.A., et al., Rapid Method for Measuring ScFv Thermal Stability by Yeast Surface Display. *Biotechnol Prog*. 2003. 19(2):631-8.
16. Kolmar, H. et al., Alternative binding proteins: biological activity and therapeutic potential of cysteine-knot miniproteins. *The FEBS Journal*. 2008. 275(11):26684-90.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> LOW, Philip
CHU, Haiyan
LEE, Yong G
- 40 <120> CÉLULAS T QUE EXPRESAN UN RECEPTOR ANTIGÉNICO QUIMÉRICO COMO TERAPIA CONTRA EL CÁNCER

<130> 61283
- 45 <150> US 61/740.384
<151> 20-12-2012

<160> 2
- 50 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 8561
<212> ADN
- 55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> construcción de expresión en lentivirus que codifica un receptor antigénico quimérico
- 60 <400> 1

ES 2 776 698 T3

acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca	60
acatgcotta caaggagaga aaaagcaccg tgcattgcca ttggtggaag taaggtggtgta	120
cgatcgtgoc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga	180
attgocgcat tgcagagata ttgtatttaa gtgocctagct cgatacataa acgggtctct	240
ctggtagac cagatctgag cctgggagct ctctggctaa ctagggaacc cactgcttaa	300
gcctcaataa agcttgccctt gagtgtctca agtagtgtgt gcccgctctgt tgtgtgactc	360
tgtaactag agatccctca gacccttcta gtcagtgtgg aaaatctcta gcagtggcgc	420
ccgaacaggg acttgaaagc gaaagggaaa ccagaggagc tctctcgacg caggactcgg	480
cttgtggaag cgcgcacggc aagaggcgag gggcggcgac tggtagtac gccaaaaatt	540
ttgactagcg gaggctagaa ggagagagat gggtagcaga gcgtcagtat taagcggggg	600
agaattagat cgcgatggga aaaaattcgg ttaaggccag ggggaaagaa aaaaataaaa	660
ttaaaacata tagtatgggc aagcaggag ctagaacgat tcgcagttaa tcctggcctg	720
ttagaaacat cagaaggctg tagacaaata ctgggacagc tacaaccatc ccttcagaca	780
ggatcagaag aacttagatc attatataat acagtagcaa ccctctattg tgtgcatcaa	840
aggatagaga taaaagacac caaggaagct ttagacaaga tagaggaaga gcaaaacaaa	900
agtaagacca cgcacagca agcggccact gatcttcaga cctggaggag gagatatgag	960
ggacaattgg agaagtgaat tatataaata taaagtagta aaaattgaac cattaggagt	1020
agcaccacc aaggcaaga gaagagtggg gcagagagaa aaaagagcag tgggaatagg	1080

ES 2 776 698 T3

agctttgttc cttgggttct tgggagcagc aggaagcact atgggcgag cgtcaatgac 1140
 gctgacggta caggccagac aattattgtc tggatatagt cagcagcaga acaatttgct 1200
 gagggctatt gaggcgcaac agcatctggt gcaactcaca gtctggggca tcaagcagct 1260
 ccaggcaaga atcctggctg tggaaagata octaaaggat caacagctcc tggggatttg 1320
 gggttgctct ggaaaactca tttgcaccac tgctgtgcct tggaatgcta gttggagtaa 1380
 taaatctctg gaacagattt ggaatcacac gaactggatg gagtgggaca gagaaattaa 1440
 caattacaca agcttaatac actccttaat tgaagaatcg caaaaccagc aagaaaagaa 1500
 tgaacaagaa ttattggaat tagataaatg ggcaagtttg tggattggt ttaacataac 1560
 aaattggctg tggatatata aattattcat aatgatagta ggaggcttg taggtttaag 1620
 aatagttttt gctgtacttt ctatagtga tagagttagg cagggatatt caccattatc 1680
 gtttcagacc cacctcccaa ccccgagggg acccgacagg cccgaaggaa tagaagaaga 1740
 aggtggagag agagacagag acagatccat tcgattagt aacggatctc gacggtatcg 1800
 gttaactttt aaaagaaaag gggggatttg ggggtacagt gcaggggaaa gaatagtaga 1860
 cataatagca acagacatac aaactaaaga attacaaaa caattacaa aattcaaaat 1920
 tttatcgata ctagtaagga tctgcgatcg ctccgggtgcc cgtcagtggg cagagcgcac 1980
 atcgcccaca gtccccgaga agttgggggg aggggtcggc aattgaacgg gtgcctagag 2040
 aaggtggcgc ggggtaaact gggaaagtga tgtcgtgtac tggctccgcc tttttccga 2100
 ggggtggggga gaaccgtata taagtgcagt agtcgcctg aacgttcttt ttocgaacgg 2160
 gtttgccgcc agaacacagc tgaagcttgc aggggctcgc atctctcctt cacgcgcccg 2220
 ccgccctacc tgaggccgcc atccacgcgc gttgagtcgc gttctgccgc ctcccgcctg 2280
 tggtgccctc tgaactgcgt ccgcctcta ggtaagttta aagctcaggt cgagaccggg 2340
 cctttgtcgc gcgctcctt ggagcctacc tagactcagc cggctctoca cgtttgcct 2400
 gaccctgctt gctcaactct acgtctttgt ttogttttct gttctgcgcc gttacagatc 2460
 caagctgtga ccggcgcta ctctagagct agcgaattcg aatttaaatc ggatccgcgg 2520
 ccgccgactg tgcttctag ttgccagca tctgttgttt gccctcccc cgtgccttcc 2580
 ttgaccctgg aaggtgccac tcccactgtc ctttcctaat aaaatgagga aattgcatcg 2640
 cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg 2700
 gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat ggctctggc 2760
 ctgcacaca ttccacatcc accggtaggc gccaacggc tccgttcttt ggtggccct 2820
 tcgcgccacc ttctactcct ccctagtca ggaagttccc ccccgcccc cagctcgcgt 2880
 cgtgcaggac gtgacaaatg gaagtagcac gtctcactag tctcgtgcag atggacagca 2940

ES 2 776 698 T3

ccgctgagca atggaagcgg gtaggccttt ggggcagcgg ccaatagcag ctttgctcct 3000
 tcgctttctg ggctcagagg ctggaaggg gtgggtccgg gggcgggctc aggggcgggc 3060
 tcaggggggg ggcggggcgc cgaaggtoct ccggaggccc ggcattctgc acgcttcaaa 3120
 agcgcacgtc tgccgcgctg ttctcctctt cctcatctcc gggcctttcg acctgcatct 3180
 agagccgcca tggettacc atacgatggt ccagattacg ctagtttggt gaggcagcag 3240
 agaccgatgg agagcgacga gagcggcctg cccgccatgg agatcgagtg ccgcatcacc 3300
 ggcaccctga acggcgtgga gttcgagctg gtgggcggcg gagagggcac ccccaagcag 3360
 ggcgcgatga ccaacaagat gaagagcacc aaaggcggcc tgacctcag cccctacctg 3420
 ctgagccacg tgatgggcta cggcttctac cacttcggca cctaccccag cggctacgag 3480
 aacccttcc tgcacgccat caacaacggc ggctacacca acaccgcat cgagaagtac 3540
 gaggacggcg gcggtctgca cgtgagcttc agctaccgct acgaggccgg ccgctgatc 3600
 ggcgacttca aggtggtggg caccggcttc cccgaggaca gcgtgatctt caccgacaag 3660
 atcatccgca gcaacgccac cgtggagcac ctgcaccca tgggcgataa cgtgctggtg 3720
 ggcagcttcg cccgcacctt cagcctgogc gacggcggct actacagctt cgtggtggac 3780
 agccacatgc acttcaagag cgccatccac cccagcatcc tgcagaacgg gggcccccag 3840
 ttgccttcc gccgcgtgga ggagctgca agcaacaccg agctgggcat cgtggagtac 3900
 cagcacgect tcaagacccc catcgccttc gccagatccc gcgctcagtc gtccaattct 3960
 gccgtggacg gcaccgccgg acccggctcc accgatctc gcgagggcag aggaagtctt 4020
 ctaacatgcg gtgacgtgga ggagaatccc ggccctatga ccgagtacaa gccacgggtg 4080
 cgctctgcca cccgcgacga cgtcccagg gccgtacgca cctcgcgcgc cgcgttcgcc 4140
 gactaccccg ccacgcgcca caccgtgat ccggaccgcc acatcgagcg ggtcaccgag 4200
 ctgcaagaac tcttctcac gcgcgtggg ctcgacatcg gcaagggtgtg ggtcgcggac 4260
 gacggcgcgc cgggtggcgg ctggaccacg ccggagagcg tcgaagcggg ggcgggtgtc 4320
 gccgagatcg gcccgcgcat ggccgagttg agcggttccc ggctggcccgc gcagcaacag 4380
 atggaaggcc tcctggcggc gcaccggccc aaggagcccg cgtggttctt ggccaccgtc 4440
 ggcgtctcgc ccgaccacca gggcaagggt ctgggcagcg ccgtcgtgct ccccgagtg 4500
 gaggcggccg agcgcgccgg ggtgcccgc ttcttgaga cctccgcgc cgcgaacctc 4560
 cccttctacg agcggctcgg cttcacogtc accgccgacg tcgaggtgoc cgaaggaccg 4620
 cgcacctggt gcatgaccgc caagcccggg gcctgaaatc aacctctgga ttacaaaatt 4680
 tgtgaaagat tgactggtat tcttaactat gttgctcctt ttacgctatg tggatacgtc 4740
 gctttaatgc ctttgatca tgctattgct tcccgatgg ctttcatttt ctctccttg 4800
 tataaatcct ggttgctgtc tctttatgag gagttgtggc ccgttgctcag gcaacgtggc 4860

ES 2 776 698 T3

gtgggtgtgca ctgtgtttgc tgacgcaacc cccactgggt ggggcattgc caccacctgt 4920
 cagctccttt cgggacttt cgctttcccc ctccctattg ccacggcgga actcatcgcc 4980
 gcctgccttg cccgctgctg gacaggggct cggctggttg gactgacaa ttccgtggtg 5040
 ttgtcgggga aatcatcgtc ctttcottgg ctgctcgct gtgttgccac ctggattctg 5100
 cgcgggacgt ccttctgcta cgtcccttcg gccctcaatc cagcggacct tccttccgcg 5160
 ggctgctgc cggctctgcg gctcttcog cgtctccgcc ttccctca gacgagtcgg 5220
 atctcccttt ggccgctcc ccgctggta cctttaagac caatgactta caaggcagct 5280
 gtagatctta gccacttttt aaaagaaaag gggggactgg aagggtaat tcaactccaa 5340
 cgaagataag atctgctttt tgcttgact gggctctctt ggtagacca gatctgagcc 5400
 tgggagctct ctggctaact agggaaccca ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga 5460
 gtgcttcaag tagtgtgtgc cgtctgttg tgtgactctg gtaactagag atccctcaga 5520
 ccttttagt cagtgtggaa aatctctagc agtagtagtt catgtcatct tattattcag 5580
 tattataac ttgcaaagaa atgaatatca gagagtgaga ggaacttgtt tattgcagct 5640
 tataatggtt acaataaag caatagcatc acaaatttca caataaagc attttttca 5700
 ctgcattcta gttgtggtt gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt ctggctctag 5760
 ctatcccgcc cctaactcog ccaggttcog ccattctcc gcccatggc tgactaattt 5820
 tttttattta tgcagaggcc gaggcogct cggcctctga gctattccag aagtagtgag 5880
 gaggcttttt tggaggcta gacttttgca gagacggccc aaattogtaa tcatggtcat 5940
 agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa 6000
 gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaat gagtgagcta actcacatta attgcggtgc 6060
 gctcaactgc cgtttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatggcc 6120
 aacgcgcggg gagaggcgt ttgogtattg ggcgctctc cgcttctcg ctcaactgact 6180
 cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgoggcgag cggtatcagc tcaactcaaag gcgtaatac 6240
 ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa 6300
 aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg 6360
 acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa 6420
 gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgcgcg 6480
 ttaccgata cctgtcogcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac 6540
 gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttogctccaa gctgggctgt gtgcacgaac 6600
 cccccgttca gccgcaccgc tgcgccttat ccggttaacta tcgtcttgag tccaaccgg 6660
 taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc agagcgaggt 6720

ES 2 776 698 T3

atgtaggogg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga 6780
cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct 6840
cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga 6900
ttacgcgag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctgacg 6960
ctcagtgga cgaaaactca cgtaaggga ttttggtcat gagattatca aaaaggatct 7020
tcacctagat ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt 7080
aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc 7140
tatttcgttc atccatagtt gctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg 7200
gcttaaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggctccag 7260
atztatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt 7320
tatccgcctc catccagtct attaattggt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag 7380
ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt 7440
ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca 7500
tgttgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg gtcctccgat cgttgtcaga agtaagttgg 7560
ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgocat 7620
ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaacca gtcattctga gaatagtgt 7680
tgccgagacc gagttgctct tgccccgct caatacggga taataccgag ccacatagca 7740
gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct 7800
taccgctggt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat 7860
cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa 7920
aggaataag ggcgacacgg aaatggtgaa tactcactact cttocttttt caatattatt 7980
gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa 8040
ataaacaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa 8100
ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgtat cagcaggccc tttcgtctcg 8160
cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca gctcccgag acggtcacag 8220
cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac aagcccgtca gggcgcgtca gcgggtgttg 8280
gcgggtgtcg gggctggctt aactatgagg catcagagca gattgtaactg agagtgcacc 8340
atatgcggtg tgaataaccg cacagatgag taaggagaaa ataccgcatc aggcgccatt 8400
cgccattcag gctgcgcaac tgttggaag ggcgatcggg gcgggcctct tcgctattac 8460
gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa ggcgattaag ttgggtaacg ccagggtttt 8520
cccagtcagc acgttgtaaa acgacggcca gtgccaagct g 8561

<210> 2
<211> 1533
<212> ADN

ES 2 776 698 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia del polinucleótido que codifica el receptor antigénico quimérico CAR4-1BBZ

5

<400> 2

```

atggcctcac cgttgaccocg ctttctgtog ctgaaacctgc tgctgctggg tgagtogatt      60
atcctgggga gtggagaagc tgatgtcgtg atgaccocaga cccccctcag cctcccagtg      120
tccctcggtg accaggcttc tattagttgc agatccagcc agtcacctcgt gcactctaac      180
ggtaatacct acctgagatg gtatctccag aagcccggac agagccetaa ggtgctgac      240
tacaaagtct ccaaccgggt gtctggagtc cctgaccgct tctcagggag cggttccggc      300
accgacttca ccoctgaagat caaccgggtg gaggccgaag acctcggcgt ctatttctgc      360
tctcagagta cacatgtgcc ctggaccttc ggcggaggga ccaagctgga gatcaaaagc      420
tccgcagacg atgccaagaa agatgccgct aagaaagacg atgctaagaa agacgatgca      480
aagaaagacg gtggcgtgaa gctggatgaa accggaggag gtctcgtcca gccaggagga      540
gccatgaagc tgagttgcgt gaccagcggg ttcacctttg ggcactactg gatgaactgg      600
gtgcgacagt ccccagagaa ggggctcgaa tgggtogctc agttcaggaa caaaccoctac      660
aattatgaga catactattc agacagcgtg aagggcaggt ttactatcag tagagacgat      720
tccaaatcta gcgtgtaoct gcagatgaac aatctcaggg tcgaagatac aggcattctac      780
tattgcacag gggcatocct tggatggag tatctcggtc aggggacaag cgtcacagtc      840
agtgtgaact ctactactac caagccagtg ctgcgaactc cctcacctgt gcaccctacc      900
gggacatctc agccccagag accagaagat tgctcgcccc gtggctcagt gaaggggacc      960
ggattggact tcgcctgtga tatttacatc tgggcacctc tggccggaat ctgogtggcc     1020
cttctgctgt cottgatcat cactctcctc totgtgctca aatggatcag gaaaaaatc     1080
cccacatat tcaagcaacc atttaagaag accactggag cagctcaaga ggaagatgct     1140
tgtagctgcc gatgtccaca ggaagaagaa ggaggaggag gaggctatga gctgagagca     1200
aaattcagca ggagtgcaga gactgctgcc aacctgcagg accccaacca gctctacaat     1260
gagctcaatc tagggcgaag agaggaatat gacgtcttgg agaagaagcg ggctcgggat     1320
ccagagatgg gaggcaaaca gcagaggagg aggaaccccc aggaaggcgt atacaatgca     1380
ctgcagaaag acaagatggc agaagcctac agtgagatcg gcacaaaagg cgagaggogg     1440
agaggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagca ctgccaccaa ggacacctat     1500
gatgcctcgc atatgcagac cctggcccct cgc                                     1533

```

REIVINDICACIONES

1. Un agente terapéutico del cáncer de dos componentes que comprende:

5 (a) un conjugado de moléculas pequeñas (Small Conjugate Molecule, SCM) que comprende un resto
 direccionado conjugado con un ligando de receptor tumoral, donde el ligando del receptor tumoral es un folato; y
 (b) linfocitos citotóxicos que expresan un receptor antigénico quimérico (Chimeric Antigen Receptor, CAR), donde
 el CAR es una proteína de fusión que comprende una región de reconocimiento, un dominio de co-estimulación y
 un dominio de señalización de la activación, y donde el CAR tiene una especificidad de unión para el resto
 10 direccionado o puede unirse al resto direccionado.

2. El agente terapéutico del cáncer de dos componentes de la reivindicación 1, donde el resto direccionado y el
 ligando se conjugan mediante un dominio enlazador, donde el dominio enlazador se selecciona de entre el grupo
 que consiste en polietilenglicol (PEG), poliprolina, un aminoácido hidrofílico, un azúcar, un peptidoglicano no natural,
 15 polivinilpirrolidona, y pluronic F-127.

3. El agente terapéutico del cáncer de dos componentes de la reivindicación 1, donde el resto direccionado es FITC.

4. El agente terapéutico del cáncer de dos componentes de la reivindicación 2, donde el resto direccionado es FITC
 20 y el enlazador es (PEG)₁₂.

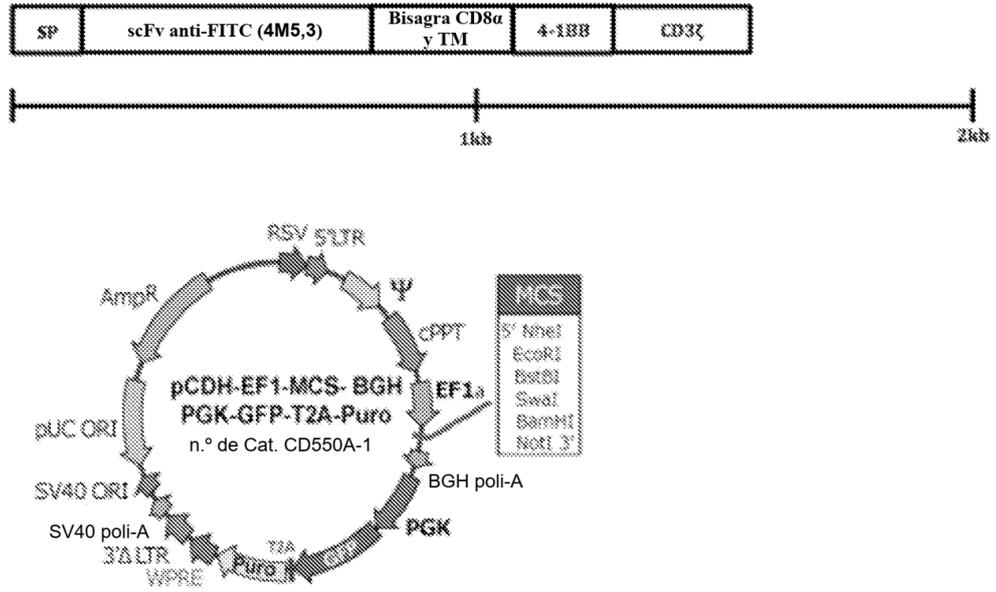
5. El agente terapéutico del cáncer de dos componentes de la reivindicación 3 o 4, donde la región de
 reconocimiento del CAR es un fragmento de la región variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo anti-FITC.

25 6. El agente terapéutico del cáncer de dos componentes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5
 para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un sujeto, donde el cáncer se selecciona de entre el grupo
 que consiste en cáncer de cerebro, tiroides, pulmón, páncreas, riñón, estómago, estroma gastrointestinal,
 endometrio, mama, cuello uterino, ovario, colon, próstata, leucemia, linfoma y de cabeza y cuello,
 donde dicho método comprende

30 (a) el cultivo de una población de linfocitos citotóxicos bajo condiciones que promuevan la activación;
 (b) la transfección de la población de linfocitos de (a) con un vector que codifica un receptor antigénico quimérico
 (CAR), donde el CAR es una proteína de fusión que comprende una región de reconocimiento, un dominio de co-
 estimulación y un dominio de señalización de la activación;
 35 (c) la administración de un número terapéuticamente eficaz de los linfocitos transfectados de (b) a un sujeto que
 tenga cáncer; y
 (d) la administración de un conjugado de moléculas pequeñas (SCM) que comprende un resto direccionado
 conjugado con un ligando de receptor tumoral al sujeto, donde el ligando es reconocido y se une a un receptor
 sobre la superficie de una célula del cáncer, y donde el CAR tiene una especificidad de unión por el resto
 40 direccionado o se puede unir mediante el resto direccionado.

Figura 1A. La construcción de CAR4-1BBZ sobre las células T transducidas

A



Figuras 1B y C. La expresión de CAR4-1BBZ sobre las células T transducidas

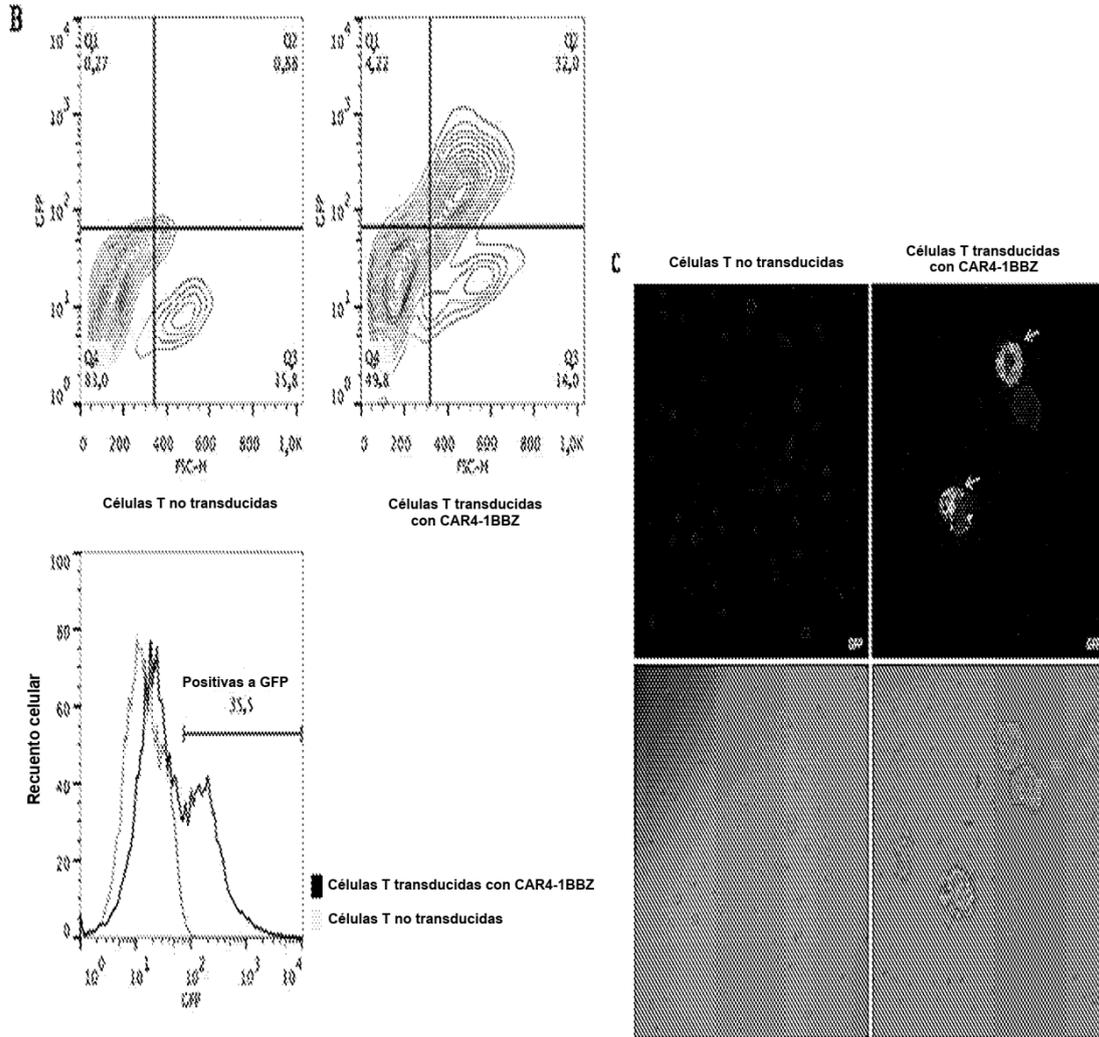


Figura 2. Unión de los conjugados FITC-Folato y FITC-(PEG)₁₂-Folato a las células T transfectadas con CAR

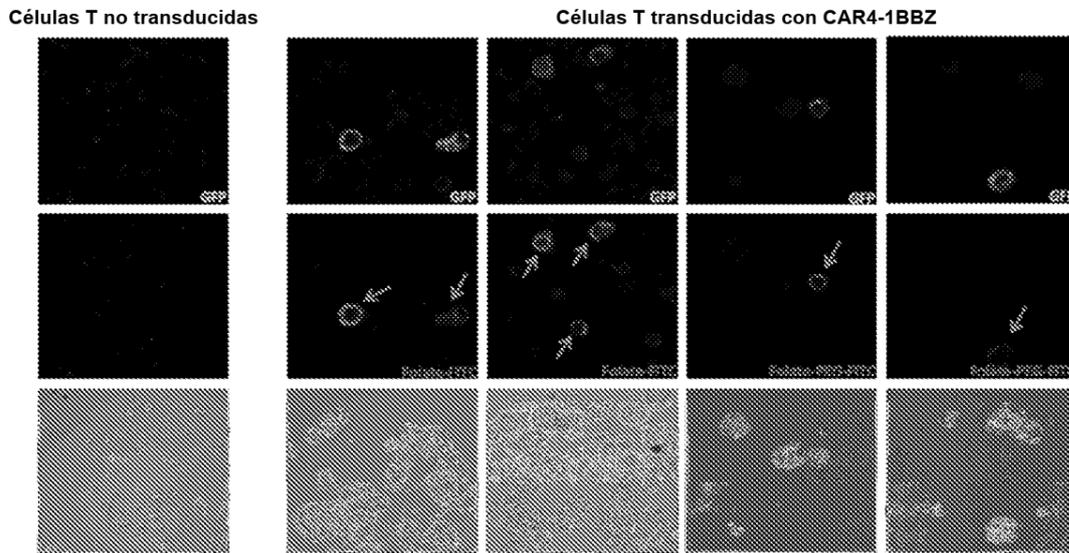


Figura 3A. La unión del conjugado FITC-Folato (EC17) a las células cancerosas (KB)

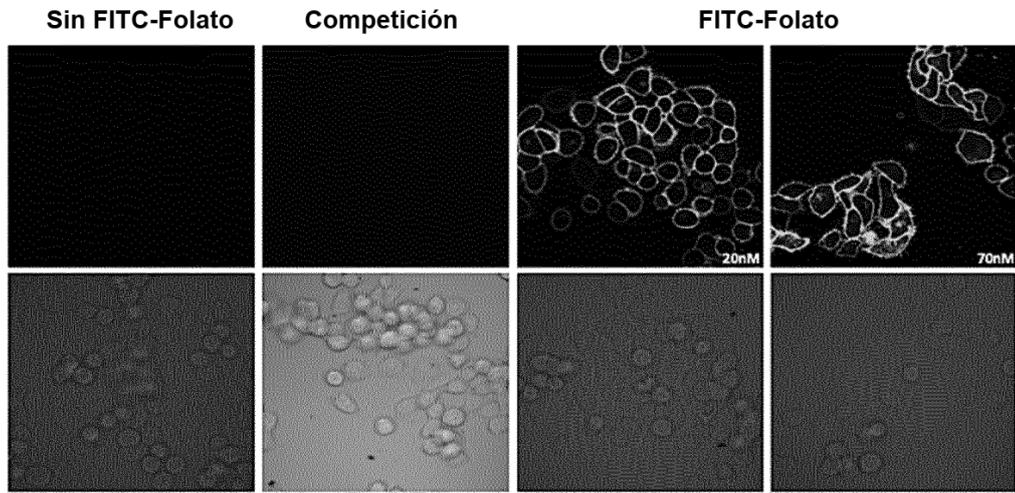


Figura 3B. La unión del conjugado FITC-Folato (EC17) a las células cancerosas (L1210A)

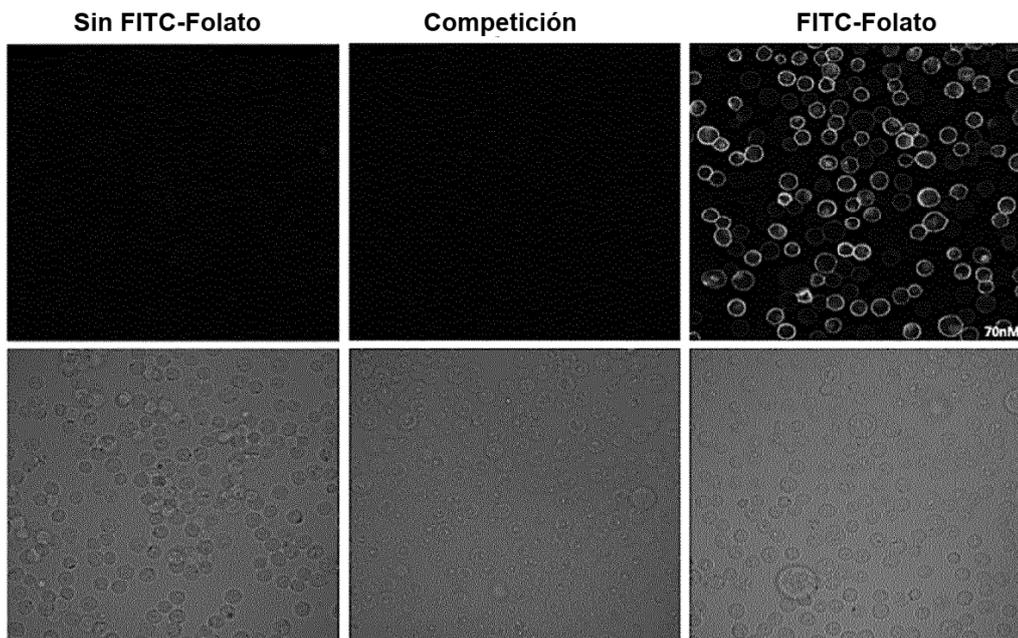


Figura 3C. La unión del conjugado FITC-(PEG)₁₂-Folato a las células cancerosas (KB)

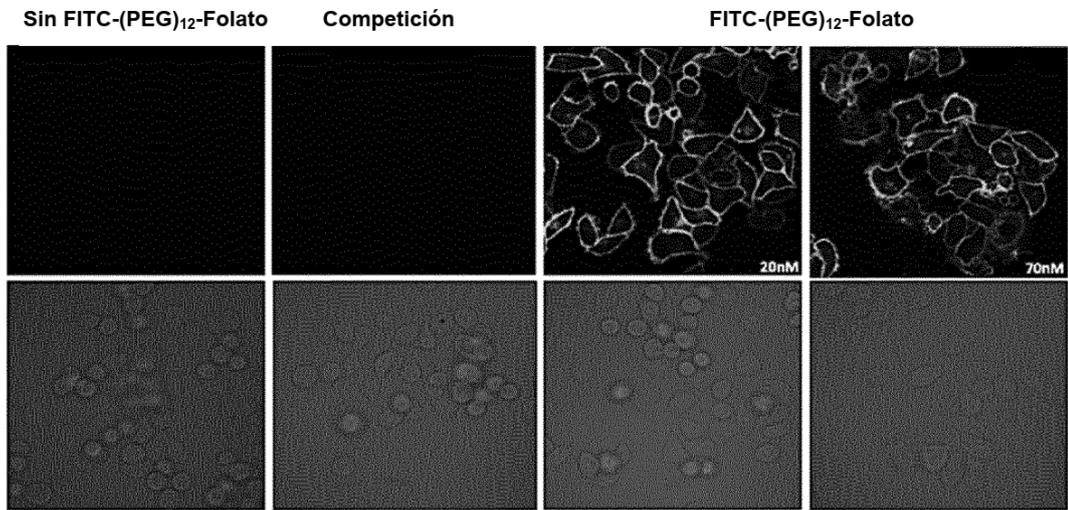


Figura 3D. La unión del conjugado FITC-(PEG)₁₂-Folato a las células cancerosas (L1210A)

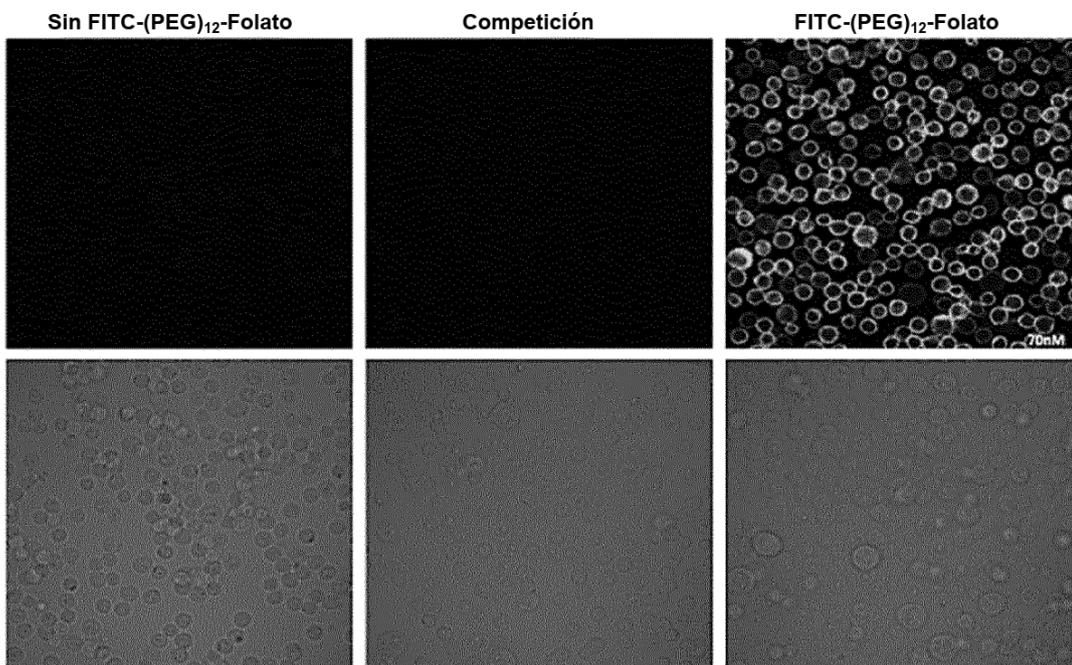


Figura 4A

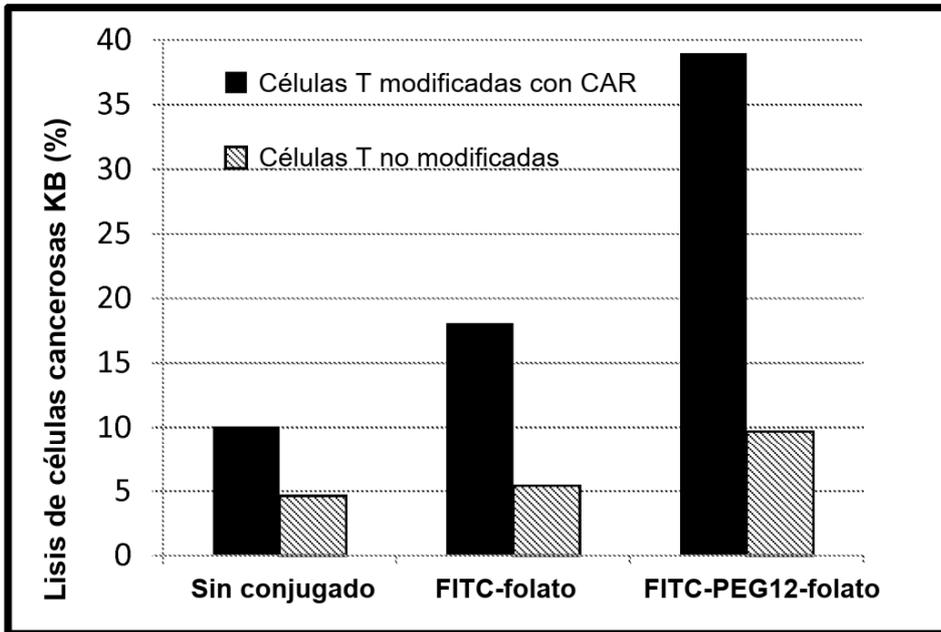


Figura 4B

