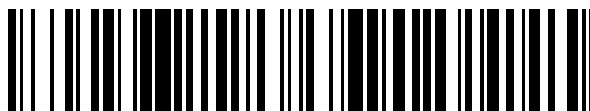


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 701**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2013** **E 18154090 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020** **EP 3338794**

54 Título: **Gestión de toxicidad para la actividad antitumoral de CAR**

30 Prioridad:

13.07.2012 US 201261671482 P
14.03.2013 US 201361782982 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
11.08.2020

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA, CENTER FOR TECHNOLOGY
TRANSFER (50.0%)**
3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia, PA 19104-6283, US y
THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA
(50.0%)

72 Inventor/es:

JUNE, CARL, H.;
LEVINE, BRUCE, L.;
KALOS, MICHAEL D. y
GRUPP, STEPHAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 778 701 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

Gestión de toxicidad para la actividad antitumoral de CAR

5 Antecedentes de la invención

Los pacientes con leucemia linfocítica aguda (LLA) recidivante y refractaria a quimioterapia tienen un mal pronóstico, a pesar del uso de terapias agresivas tales como el trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas (Barrett et al., 1994, N Engl J Med 331:1253-8; Gokbuget et al., 2012, Blood 120:2032-41) y fragmentos de anticuerpos CD19
 10 bispecíficos (Bargou et al., 2008, Science 321:974-7). Los linfocitos T modificados de receptor de antígeno quimérico que se dirigen a antígenos CD19 y CD20 específicos de linajes se han notificado como eficaces en adultos con linfomas LLC y de linfocitos B (Till et al., 2008, Blood 112:2261-71; Kochenderfer et al., 2010, Blood 116:4099-102; Brentjens et al., 2011, Blood 118:4817-28; Porter et al., 2011, N Engl J Med 365:725-33; Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73; Savoldo et al., 2011, J Clin Invest 121:1822-5). Sin embargo, los efectos de los
 15 linfocitos T de CAR en blastos de LLA, una leucemia más inmadura con una progresión más rápida, no se han investigado completamente.

Se ha notificado la presentación tardía del síndrome de lisis tumoral y secreción de citocinas, junto a la fuerte expansión de linfocitos T de receptor de antígeno quimérico *in vivo* (Porter et al., 2011, N Engl J Med 365:725-33; Kalos et al.,
 20 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73). Sin embargo, los efectos de la secreción de citocinas y los trastornos asociados con la expansión de linfocitos T de receptor de antígeno quimérico no se han investigado completamente.

Por tanto, existe una necesidad urgente en la técnica en cuanto a composiciones y métodos para el tratamiento del cáncer utilizando CAR y abordar la toxicidad de los CAR. La presente invención aborda esta necesidad.

25 Sumario de la invención

Según un primer aspecto de la invención, se proporcionan linfocitos T transducidos para expresar un receptor de antígeno quimérico (linfocitos T de CAR) para usarse en un método de tratamiento de cáncer en un paciente, en el
 30 que el método comprende la infusión de dichos linfocitos T de CAR al paciente y la administración de un inhibidor de citocinas para gestionar la toxicidad que resulta de la infusión de linfocitos T de CAR, en el que el inhibidor de citocinas es un inhibidor de IL-6.

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un inhibidor de citocinas para usar en un método de gestión de la toxicidad que resulta de la infusión de linfocitos T transducidos para expresar un receptor de antígeno quimérico (linfocitos T de CAR) en un paciente, en el que los linfocitos T de CAR se utilizan para tratar el cáncer en el paciente,
 35 en el que adicionalmente dicho inhibidor de citocinas es un inhibidor de IL-6.

En cualquier aspecto de la invención, el inhibidor de IL-6 puede ser un inhibidor de ácido nucleico tal como un ARN pequeño de interferencia (ARNip) o un ARN antisentido, un anticuerpo o una molécula química pequeña. El inhibidor de IL-6 puede ser un anticuerpo de anti-IL-6 que se une específicamente a IL-6 o el inhibidor de IL-6 puede ser
 40 tocilizumab.

En cualquier aspecto de la invención, el CAR puede comprender un dominio extracelular que tiene un dominio de reconocimiento de antígeno que se dirige a un antígeno tumoral, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico. El CAR puede ser un CAR de anti-CD 19, opcionalmente en el que la fracción de unión al antígeno se fusiona con uno o más dominios intracelulares seleccionados de un dominio de señalización de CD137 (4-1BB), un
 45 dominio de señalización de CD28, un dominio de señal de Cd3zeta y cualquier combinación de los mismos. La toxicidad puede ser el síndrome de liberación de citocinas, que conduce a linfocitosis hemofagocítica / síndrome de activación de macrófagos. Los linfocitos T de CAR pueden inducir niveles elevados de IFN- γ , TNF α e IL-2 en el paciente. Los niveles de cualquier citocina seleccionada de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-2R, IFN- α , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, TNF α , GM-CSF, G-CSF, CXCL9, CXCL 10, factores de CXCR, VEGF, RANTES, EOTAXINA, EGF, HGF, FGF- β , CD40, CD40L y ferritina pueden incrementarse o disminuir como
 50 resultado de recibir dicha infusión de linfocitos T de CAR.

55 En cualquier aspecto de la invención, el cáncer puede ser:

- (i) un cáncer hematológico, por ejemplo, leucemia aguda (tal como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia),
 60 leucemia crónica (tal como leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (formas indolente y de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de la cadena pesada, síndrome mielodisplásico, leucemia de células pilosas y mielodisplasia; LLA de pre-B (indicación pediátrica), LLA de adultos, linfoma de células del manto o linfoma difuso de linfocitos B grandes, en el que adicionalmente el CAR es un CAR de anti-CD 19;
- (ii) un tumor sólido;

- (iii) un cáncer primario o metastásico; y/o
- (iv) resistente o refractario a la quimioterapia convencional.

En cualquier aspecto de la invención, el CAR se puede diseñar para dirigirse a CD19 y el cáncer se selecciona de pre-LLAB (indicación pediátrica), LLA de adultos, linfoma de células del manto y linfoma difuso de linfocitos B grandes. Los linfocitos T de CAR pueden ser linfocitos T humanos transducidos *in vivo* con un vector que expresa el CAR y los linfocitos T de CAR pueden ser autólogos para el paciente. Los linfocitos T de CAR pueden administrarse como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/u otros componentes, pero no con IL-2. El método de tratamiento de cáncer puede comprender adicionalmente la administración de un esteroide y/o un inhibidor de TNF α , por ejemplo, etanercept, al paciente.

La divulgación proporciona un método para tratar un paciente que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociados con una expresión elevada de un antígeno tumoral. En un caso, el método comprende la administración de una terapia de primera línea y una terapia de segunda línea al paciente que las necesita, en el que la terapia de primera línea comprende la administración al paciente de una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un CAR, en el que el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio de transmembrana y un dominio de señalización intracelular.

En un caso, después de la administración de la terapia de primera línea, los niveles de citocina en el paciente se monitorizan para determinar el tipo adecuado de terapia de segunda línea a administrar al paciente y la terapia de segunda línea adecuada se administra al paciente que la necesita.

En un caso, un incremento en el nivel de una citocina identifica un tipo de terapia inhibidora de citocinas para administrarse al paciente que la necesita.

En un caso, la citocina se selecciona del grupo que consiste en IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-1Ra, IL-2R, IFN- α , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, TNF α , GM-CSF, G-CSF, CXCL9, CXCL10, factores CXCR, VEGF, RANTES, EOTAXINA, EGF, HGF, FGF- β , CD40, CD40L, ferritina y cualquier combinación de los mismos.

En un caso, la terapia inhibidora de citocinas se selecciona del grupo que consiste en un ARN pequeño de interferencia (ARNip), un microARN, un ácido nucleico antisentido, una ribozima, un vector de expresión que codifica un mutante negativo transdominante, un anticuerpo, un péptido, una molécula pequeña, un fármaco inhibidor de citocina y cualquier combinación de los mismos.

En un caso, los niveles de citocina se monitorizan mediante la detección del nivel de proteínas de la citocina en una muestra biológica del paciente.

En un caso, los niveles de citocina se monitorizan mediante la detección del nivel de ácido nucleico de la citocina en una muestra biológica del paciente.

La divulgación proporciona un método para reducir o evitar un efecto adverso asociado a la administración de una célula modificada genéticamente para expresar un CAR, en el que el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio de transmembrana y un dominio de señalización intracelular, el método que comprende la monitorización de los niveles de una citocina en un paciente para determinar el tipo adecuado de terapia de citocinas a administrar al paciente y la administración de la terapia de citocinas adecuada al paciente.

En un caso, un incremento en el nivel de una citocina identifica un tipo de terapia inhibidora de citocinas para administrar al paciente que la necesita.

En un caso, la citocina se selecciona del grupo que consiste en IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-1Ra, IL-2R, IFN- α , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, TNF α , GM-CSF, G-CSF, CXCL9, CXCL10, factores CXCR, VEGF, RANTES, EOTAXINA, EGF, HGF, FGF- β , CD40, CD40L, ferritina y cualquier combinación de los mismos.

En un caso, la terapia inhibidora de citocinas se selecciona del grupo que consiste en un ARN pequeño de interferencia (ARNip), un microARN, un ácido nucleico antisentido, una ribozima, un vector de expresión que codifica un mutante negativo transdominante, un anticuerpo intracelular, un péptido, una molécula pequeña, un fármaco inhibidor de citocina y cualquier combinación de los mismos.

En un caso, los niveles de citocina se monitorizan mediante la detección del nivel de proteínas de la citocina en una muestra biológica del paciente.

En un caso, los niveles de citocina se monitorizan mediante la detección del nivel de ácido nucleico de la citocina en una muestra biológica del paciente.

Breve descripción de los dibujos

La siguiente descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención se entenderá mejor cuando se lea junto con los dibujos adjuntos. Con el fin de ilustrar la invención, se muestran en los dibujos realizaciones que se prefieren actualmente. Debería entenderse, sin embargo, que la invención no se limita a las disposiciones e instrumentos precisos de las realizaciones mostradas en los dibujos.

La Figura 1 es una imagen que demuestra los niveles de citocinas de suero en cuatro pacientes diferentes. Todos los pacientes mostraron liberación de citocinas, incluyendo la IL-6.

La Figura 2 es una imagen que representa las citocinas de suero en un gráfico de un paciente representativo. El paciente estuvo críticamente enfermo los días 5 a 7 y solo empezó a mejorar después de la administración de tocilizumab.

La Figura 3 es una imagen que demuestra que las intervenciones de anticuerpos no impactan sobre la funcionalidad celular de CART 19 como se midió para marcadores de la actividad de los linfocitos T (perforina e IFN- γ).

La Figura 4, que comprende las Figuras 4A a 4C, es una serie de imágenes que representan respuestas clínicas. La Figura 4A muestra dos niñas con recaídas múltiples de leucemia linfoblástica aguda de precursores de linfocitos B CD19+ refractaria a quimioterapia que se trataron con células CTL019, infundidas el Día 0. Los cambios en la lactato deshidrogenasa (LDH) de suero y la temperatura corporal tras la infusión de CTL019, con temperatura máxima por periodo de 24 horas se marcan con círculos. El CHOP-100 recibió metilprednisolona comenzando el día 5 a 2 mg/kg/día, disminuido hasta retirarlo el día 12. La mañana del día 7, recibió etanercept 0.8 mg/kg x 1. A las 6pm de la noche del día 7, se administró tocilizumab 8 mg/kg x 1. Se produjo una mejora transitoria en la pirexia con la administración de corticoesteroides el día 5 en CHOP-100, con resolución completa de fiebre que sucede a la administración de terapia dirigida de citocinas que consiste en etanercept y tocilizumab el día 8. La Figura 4B muestra las citocinas de suero y los marcadores inflamatorios medidos en puntos temporales frecuentes tras la infusión de CTL019. Los valores de citocinas se muestran utilizando un gráfico semilogarítmico con factor de cambio respecto al inicio. Los valores iniciales (Día 0 preinfusión) (pg/ml de suero) para cada analito fueron (CHOP-100, CHOP-101): IL1- β : (0,9, 0,2); IL-6: (4,3, 1,9); TNF- α : (1,5, 0,4); IL2R α : (418,8, 205,7); IL-2: (0,7, 0,4); IL-10 (9,9, 2,3); IL1R α : (43,9, 27,9). Ambas pacientes desarrollaron elevaciones pronunciadas en un número de citocinas y de receptores de citocina, incluyendo el receptor soluble de interleucinas 1A y 2 (IL-1RA e IL-2R), interleucinas 2, 6 y 10 (IL-2, IL-6 e IL-10), factor- α de necrosis tumoral (TNF- α) e interferón- γ (INF- γ). La figura 4C muestra cambios en el recuento absoluto de neutrófilos en circulación (ANC), el recuento absoluto de linfocitos (RAL) y el recuento de leucocitos (WBC; del inglés, White Blood Cell Count). Cabe destacar que, el incremento en el RAL estuvo compuesto principalmente de linfocitos T CT019 activados.

La Figura 5, que comprende las Figuras 5A a 5D, es una serie de imágenes que representan la expansión y visualización de células CTL019 en sangre periférica, médula ósea y LCR. La Figura 5A muestra análisis de citometría de flujo de sangre periférica teñida con anticuerpos para detectar CD3 y el CAR de anti-CD 19. Se representan los porcentajes de células de CD3 que expresan el CAR en CHOP-100 y CHOP-101. La Figura 5B muestra la presencia de linfocitos T CTL019 en sangre periférica, médula ósea y LCR mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El ADN genómico se aisló de sangre completa, aspirados de médula ósea y LCR, recogidos en puntos temporales en serie después de la infusión de CTL019. La Figura 5C muestra la detección de citometría de flujo de células CTL019 en LCR recogido de CHOP-100 y CHOP-101. La Figura 5D muestra imágenes de linfocitos granulares de grandes dimensiones activados en frotis teñidos con Wright de la sangre periférica y de citospinas del LCR.

La Figura 6 es una imagen que muestra la expresión de CD19 al inicio y en la recaída en CHOP-101. Las muestras de médula ósea de CHOP-101 se obtuvieron antes de la infusión de CTL019 y al tiempo de recaída 2 meses después. Las células mononucleares aisladas de muestras de médula se tiñeron para CD45, CD34 y CD19 y se analizaron en un citómetro de flujo Accuri C6. Después de ajustar en células vivas, la ventana (CD45+ SSC bajo) se subregionalizó en células CD34+ y se generaron histogramas para la expresión de CD19. La línea de división representa el umbral para el mismo ajuste en controles de isotipos. Los blastos de la preterapia tienen un intervalo de distribución de CD19, con una población pequeña de células teñidas muy débilmente observadas como la cola del histograma izquierdo a 102 sobre el eje X. La muestra de recaída no tiene ningún blasto positivo de CD19. El análisis de expresión de CD19 sobre la población de blastos pretratamiento reveló una población pequeña de células CD 19 débil o negativo. La intensidad de fluorescencia media (MFI; del inglés, Mean Fluorescence Intensity) de esta población pequeña de células fue de 187 (panel izquierdo), similar al MFI de las células blásticas de recaída teñidas con anti CD 19 (201, panel derecho). La muestra de médula de la preterapia fue hipocelular con un 10 % de blastos y la muestra de médula de recaída fue normocelular con un 68 % de blastos, contabilizando diferencias en eventos disponibles para adquisición.

La Figura 7 es una imagen que muestra inducción de remisión en médula ósea en CHOP-101 en el día +23 después de la infusión de CTL019. Informe de inmunofenotipado clínico para CHOP-101 al inicio (panel superior) y en el día +23 (panel inferior). Las células se tiñeron para CD10, CD19, CD20, CD34, CD38 y CD58. Se realizó la citometría de flujo después de la lisis de las células de glóbulos rojos. El informe en el día +23 indicó que los leucocitos de la sangre consistieron en linfocitos 42,0 %, monocitos 6,0 %, formas mieloides 50,3 %, blastos mieloides 0,17 % y progenitores linfoides no viables. No hubo evidencia inmunofenotípica convincente de leucemia linfoblástica de precursores de linfocitos B residual/linfoma mediante citometría de flujo. Esencialmente, se identificaron linfocitos B no viables.

La Figura 8 es una imagen que representa la expansión *in vivo* y la persistencia de células CTL019 en sangre. El número de leucocitos (WBC), linfocitos T CD3+ y células CTL019 en sangre se muestra para CHOP-100 y CHOP-101. El número de células se muestra en un gráfico semilogarítmico.

La Figura 9, que comprende las Figuras 9A y 9B, es una serie de imágenes que demuestran que los sujetos tienen una eliminación de células CD19 positivas en médula ósea y sangre en el plazo de 1 mes tras la infusión de CTL019. La Figura 9A muestra la aplasia de linfocitos B persistente en CHOP-100. El panel superior muestra una población predominante de células blásticas leucémicas en médula ósea aspiradas de CHOP-100 que expresa CD19 y CD20 el día +6. Esta población está ausente el día +23 y a los 6 meses. La Figura 9B muestra la aplasia de linfocitos B y la emergencia de células variantes de escape de CD19 en CHOP-101. Análisis de citometría de flujo de aspirados de médula ósea de CHOP-101 teñidos con anti-CD45, CD34 y CD19. En la línea basal, la dispersión lateral y las células CD45 débil positivo se utilizaron para identificar células leucémicas que expresan cantidades variables de CD34 y CD19 al inicio. Solo los blastos de CD19 negativos se detectaron el día 64. Los valores numéricos en el panel superior representan la fracción del total de leucocitos representados en cada cuadrante. Los valores numéricos en el panel inferior representan el porcentaje de los leucocitos totales representados en la ventana CD45débil/SS bajo.

La Figura 10 es un gráfico que representa los niveles de ferritina presente en el paciente tras la recepción de linfocitos T de CAR.

La Figura 11 es un gráfico que representa los niveles de mioglobina presente en el paciente tras la recepción de linfocitos T de CAR.

La Figura 12 es un gráfico que representa los niveles de inhibidor-1 del activador del plasminógeno (PAI-1) presente en el paciente tras la recepción de linfocitos T de CAR.

Descripción detallada

La invención se refiere a composiciones y usos de las mismas para tratar el cáncer que incluyen, pero no se limitan a cánceres hematológicos y tumores sólidos, como se define en las reivindicaciones adjuntas. La divulgación también abarca métodos para tratar y prevenir ciertos tipos de cáncer, que incluyen cáncer primario y metastásico, así como cánceres que son refractarios o resistentes a quimioterapia convencional. Los métodos comprenden administrar a un paciente que necesita tal tratamiento o prevención una cantidad eficaz profiláctica o terapéuticamente de un linfocito T transducido para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR; del inglés, Chimeric Antigen Receptor). Las moléculas CAR son moléculas que combinan especificidad basada en anticuerpos para un antígeno deseado (por ejemplo, antígeno de tumor) con un receptor de linfocitos T que activa un dominio intracelular para generar una proteína quimérica que muestra una actividad inmunitaria celular antitumoral específica.

Como parte del régimen de tratamiento global, la divulgación abarca métodos para gestionar ciertos cánceres (por ejemplo, prevenir o prolongar su recurrencia o extender el tiempo de remisión) mediante la evaluación del perfil de factores solubles en pacientes tras la infusión de linfocitos T. Preferentemente, el perfil de factores solubles incluye la evaluación de un perfil de citocinas. Cuando el perfil de citocinas indica un incremento en una citocina particular tras la infusión de linfocitos T en comparación con el previo a la infusión de linfocitos T, un técnico experto puede elegir administrar al paciente que necesita dicha gestión una cantidad eficaz de un compuesto inhibidor de citocina o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, hidrato, estereoisómero, clatrato o profármaco para gestionar los niveles elevados de la citocina tras la infusión de linfocitos T.

La presente invención se basa parcialmente en el descubrimiento de que la identificación de una combinación única de factores cuya modulación desde el inicio o niveles preexistentes en el inicio, pueden ayudar a rastrear la activación de linfocitos T, actividad diana y efectos secundarios dañinos potenciales tras la infusión de linfocitos T de CAR con el fin de ayudar a gestionar el tratamiento del cáncer. Entre los factores ejemplares se incluyen, aunque no de forma limitante, el IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35, IL-36, IL-37, IL-38, IL-39, IL-40, IL-41, IL-42, IL-43, IL-44, IL-45, IL-46, IL-47, IL-48, IL-49, IL-50, IL-51, IL-52, IL-53, IL-54, IL-55, IL-56, IL-57, IL-58, IL-59, IL-60, IL-61, IL-62, IL-63, IL-64, IL-65, IL-66, IL-67, IL-68, IL-69, IL-70, IL-71, IL-72, IL-73, IL-74, IL-75, IL-76, IL-77, IL-78, IL-79, IL-80, IL-81, IL-82, IL-83, IL-84, IL-85, IL-86, IL-87, IL-88, IL-89, IL-90, IL-91, IL-92, IL-93, IL-94, IL-95, IL-96, IL-97, IL-98, IL-99, IL-100, IL-101, IL-102, IL-103, IL-104, IL-105, IL-106, IL-107, IL-108, IL-109, IL-110, IL-111, IL-112, IL-113, IL-114, IL-115, IL-116, IL-117, IL-118, IL-119, IL-120, IL-121, IL-122, IL-123, IL-124, IL-125, IL-126, IL-127, IL-128, IL-129, IL-130, IL-131, IL-132, IL-133, IL-134, IL-135, IL-136, IL-137, IL-138, IL-139, IL-140, IL-141, IL-142, IL-143, IL-144, IL-145, IL-146, IL-147, IL-148, IL-149, IL-150, IL-151, IL-152, IL-153, IL-154, IL-155, IL-156, IL-157, IL-158, IL-159, IL-160, IL-161, IL-162, IL-163, IL-164, IL-165, IL-166, IL-167, IL-168, IL-169, IL-170, IL-171, IL-172, IL-173, IL-174, IL-175, IL-176, IL-177, IL-178, IL-179, IL-180, IL-181, IL-182, IL-183, IL-184, IL-185, IL-186, IL-187, IL-188, IL-189, IL-190, IL-191, IL-192, IL-193, IL-194, IL-195, IL-196, IL-197, IL-198, IL-199, IL-200, IL-201, IL-202, IL-203, IL-204, IL-205, IL-206, IL-207, IL-208, IL-209, IL-210, IL-211, IL-212, IL-213, IL-214, IL-215, IL-216, IL-217, IL-218, IL-219, IL-220, IL-221, IL-222, IL-223, IL-224, IL-225, IL-226, IL-227, IL-228, IL-229, IL-230, IL-231, IL-232, IL-233, IL-234, IL-235, IL-236, IL-237, IL-238, IL-239, IL-240, IL-241, IL-242, IL-243, IL-244, IL-245, IL-246, IL-247, IL-248, IL-249, IL-250, IL-251, IL-252, IL-253, IL-254, IL-255, IL-256, IL-257, IL-258, IL-259, IL-260, IL-261, IL-262, IL-263, IL-264, IL-265, IL-266, IL-267, IL-268, IL-269, IL-270, IL-271, IL-272, IL-273, IL-274, IL-275, IL-276, IL-277, IL-278, IL-279, IL-280, IL-281, IL-282, IL-283, IL-284, IL-285, IL-286, IL-287, IL-288, IL-289, IL-290, IL-291, IL-292, IL-293, IL-294, IL-295, IL-296, IL-297, IL-298, IL-299, IL-300, IL-301, IL-302, IL-303, IL-304, IL-305, IL-306, IL-307, IL-308, IL-309, IL-310, IL-311, IL-312, IL-313, IL-314, IL-315, IL-316, IL-317, IL-318, IL-319, IL-320, IL-321, IL-322, IL-323, IL-324, IL-325, IL-326, IL-327, IL-328, IL-329, IL-330, IL-331, IL-332, IL-333, IL-334, IL-335, IL-336, IL-337, IL-338, IL-339, IL-340, IL-341, IL-342, IL-343, IL-344, IL-345, IL-346, IL-347, IL-348, IL-349, IL-350, IL-351, IL-352, IL-353, IL-354, IL-355, IL-356, IL-357, IL-358, IL-359, IL-360, IL-361, IL-362, IL-363, IL-364, IL-365, IL-366, IL-367, IL-368, IL-369, IL-370, IL-371, IL-372, IL-373, IL-374, IL-375, IL-376, IL-377, IL-378, IL-379, IL-380, IL-381, IL-382, IL-383, IL-384, IL-385, IL-386, IL-387, IL-388, IL-389, IL-390, IL-391, IL-392, IL-393, IL-394, IL-395, IL-396, IL-397, IL-398, IL-399, IL-400, IL-401, IL-402, IL-403, IL-404, IL-405, IL-406, IL-407, IL-408, IL-409, IL-410, IL-411, IL-412, IL-413, IL-414, IL-415, IL-416, IL-417, IL-418, IL-419, IL-420, IL-421, IL-422, IL-423, IL-424, IL-425, IL-426, IL-427, IL-428, IL-429, IL-430, IL-431, IL-432, IL-433, IL-434, IL-435, IL-436, IL-437, IL-438, IL-439, IL-440, IL-441, IL-442, IL-443, IL-444, IL-445, IL-446, IL-447, IL-448, IL-449, IL-450, IL-451, IL-452, IL-453, IL-454, IL-455, IL-456, IL-457, IL-458, IL-459, IL-460, IL-461, IL-462, IL-463, IL-464, IL-465, IL-466, IL-467, IL-468, IL-469, IL-470, IL-471, IL-472, IL-473, IL-474, IL-475, IL-476, IL-477, IL-478, IL-479, IL-480, IL-481, IL-482, IL-483, IL-484, IL-485, IL-486, IL-487, IL-488, IL-489, IL-490, IL-491, IL-492, IL-493, IL-494, IL-495, IL-496, IL-497, IL-498, IL-499, IL-500, IL-501, IL-502, IL-503, IL-504, IL-505, IL-506, IL-507, IL-508, IL-509, IL-510, IL-511, IL-512, IL-513, IL-514, IL-515, IL-516, IL-517, IL-518, IL-519, IL-520, IL-521, IL-522, IL-523, IL-524, IL-525, IL-526, IL-527, IL-528, IL-529, IL-530, IL-531, IL-532, IL-533, IL-534, IL-535, IL-536, IL-537, IL-538, IL-539, IL-540, IL-541, IL-542, IL-543, IL-544, IL-545, IL-546, IL-547, IL-548, IL-549, IL-550, IL-551, IL-552, IL-553, IL-554, IL-555, IL-556, IL-557, IL-558, IL-559, IL-560, IL-561, IL-562, IL-563, IL-564, IL-565, IL-566, IL-567, IL-568, IL-569, IL-570, IL-571, IL-572, IL-573, IL-574, IL-575, IL-576, IL-577, IL-578, IL-579, IL-580, IL-581, IL-582, IL-583, IL-584, IL-585, IL-586, IL-587, IL-588, IL-589, IL-590, IL-591, IL-592, IL-593, IL-594, IL-595, IL-596, IL-597, IL-598, IL-599, IL-600, IL-601, IL-602, IL-603, IL-604, IL-605, IL-606, IL-607, IL-608, IL-609, IL-610, IL-611, IL-612, IL-613, IL-614, IL-615, IL-616, IL-617, IL-618, IL-619, IL-620, IL-621, IL-622, IL-623, IL-624, IL-625, IL-626, IL-627, IL-628, IL-629, IL-630, IL-631, IL-632, IL-633, IL-634, IL-635, IL-636, IL-637, IL-638, IL-639, IL-640, IL-641, IL-642, IL-643, IL-644, IL-645, IL-646, IL-647, IL-648, IL-649, IL-650, IL-651, IL-652, IL-653, IL-654, IL-655, IL-656, IL-657, IL-658, IL-659, IL-660, IL-661, IL-662, IL-663, IL-664, IL-665, IL-666, IL-667, IL-668, IL-669, IL-670, IL-671, IL-672, IL-673, IL-674, IL-675, IL-676, IL-677, IL-678, IL-679, IL-680, IL-681, IL-682, IL-683, IL-684, IL-685, IL-686, IL-687, IL-688, IL-689, IL-690, IL-691, IL-692, IL-693, IL-694, IL-695, IL-696, IL-697, IL-698, IL-699, IL-700, IL-701, IL-702, IL-703, IL-704, IL-705, IL-706, IL-707, IL-708, IL-709, IL-710, IL-711, IL-712, IL-713, IL-714, IL-715, IL-716, IL-717, IL-718, IL-719, IL-720, IL-721, IL-722, IL-723, IL-724, IL-725, IL-726, IL-727, IL-728, IL-729, IL-730, IL-731, IL-732, IL-733, IL-734, IL-735, IL-736, IL-737, IL-738, IL-739, IL-740, IL-741, IL-742, IL-743, IL-744, IL-745, IL-746, IL-747, IL-748, IL-749, IL-750, IL-751, IL-752, IL-753, IL-754, IL-755, IL-756, IL-757, IL-758, IL-759, IL-760, IL-761, IL-762, IL-763, IL-764, IL-765, IL-766, IL-767, IL-768, IL-769, IL-770, IL-771, IL-772, IL-773, IL-774, IL-775, IL-776, IL-777, IL-778, IL-779, IL-780, IL-781, IL-782, IL-783, IL-784, IL-785, IL-786, IL-787, IL-788, IL-789, IL-790, IL-791, IL-792, IL-793, IL-794, IL-795, IL-796, IL-797, IL-798, IL-799, IL-800, IL-801, IL-802, IL-803, IL-804, IL-805, IL-806, IL-807, IL-808, IL-809, IL-810, IL-811, IL-812, IL-813, IL-814, IL-815, IL-816, IL-817, IL-818, IL-819, IL-820, IL-821, IL-822, IL-823, IL-824, IL-825, IL-826, IL-827, IL-828, IL-829, IL-830, IL-831, IL-832, IL-833, IL-834, IL-835, IL-836, IL-837, IL-838, IL-839, IL-840, IL-841, IL-842, IL-843, IL-844, IL-845, IL-846, IL-847, IL-848, IL-849, IL-850, IL-851, IL-852, IL-853, IL-854, IL-855, IL-856, IL-857, IL-858, IL-859, IL-860, IL-861, IL-862, IL-863, IL-864, IL-865, IL-866, IL-867, IL-868, IL-869, IL-870, IL-871, IL-872, IL-873, IL-874, IL-875, IL-876, IL-877, IL-878, IL-879, IL-880, IL-881, IL-882, IL-883, IL-884, IL-885, IL-886, IL-887, IL-888, IL-889, IL-890, IL-891, IL-892, IL-893, IL-894, IL-895, IL-896, IL-897, IL-898, IL-899, IL-900, IL-901, IL-902, IL-903, IL-904, IL-905, IL-906, IL-907, IL-908, IL-909, IL-910, IL-911, IL-912, IL-913, IL-914, IL-915, IL-916, IL-917, IL-918, IL-919, IL-920, IL-921, IL-922, IL-923, IL-924, IL-925, IL-926, IL-927, IL-928, IL-929, IL-930, IL-931, IL-932, IL-933, IL-934, IL-935, IL-936, IL-937, IL-938, IL-939, IL-940, IL-941, IL-942, IL-943, IL-944, IL-945, IL-946, IL-947, IL-948, IL-949, IL-950, IL-951, IL-952, IL-953, IL-954, IL-955, IL-956, IL-957, IL-958, IL-959, IL-960, IL-961, IL-962, IL-963, IL-964, IL-965, IL-966, IL-967, IL-968, IL-969, IL-970, IL-971, IL-972, IL-973, IL-974, IL-975, IL-976, IL-977, IL-978, IL-979, IL-980, IL-981, IL-982, IL-983, IL-984, IL-985, IL-986, IL-987, IL-988, IL-989, IL-990, IL-991, IL-992, IL-993, IL-994, IL-995, IL-996, IL-997, IL-998, IL-999, IL-1000, IL-1001, IL-1002, IL-1003, IL-1004, IL-1005, IL-1006, IL-1007, IL-1008, IL-1009, IL-1010, IL-1011, IL-1012, IL-1013, IL-1014, IL-1015, IL-1016, IL-1017, IL-1018, IL-1019, IL-1020, IL-1021, IL-1022, IL-1023, IL-1024, IL-1025, IL-1026, IL-1027, IL-1028, IL-1029, IL-1030, IL-1031, IL-1032, IL-1033, IL-1034, IL-1035, IL-1036, IL-1037, IL-1038, IL-1039, IL-1040, IL-1041, IL-1042, IL-1043, IL-1044, IL-1045, IL-1046, IL-1047, IL-1048, IL-1049, IL-1050, IL-1051, IL-1052, IL-1053, IL-1054, IL-1055, IL-1056, IL-1057, IL-1058, IL-1059, IL-1060, IL-1061, IL-1062, IL-1063, IL-1064, IL-1065, IL-1066, IL-1067, IL-1068, IL-1069, IL-1070, IL-1071, IL-1072, IL-1073, IL-1074, IL-1075, IL-1076, IL-1077, IL-1078, IL-1079, IL-1080, IL-1081, IL-1082, IL-1083, IL-1084, IL-1085, IL-1086, IL-1087, IL-1088, IL-1089, IL-1090, IL-1091, IL-1092, IL-1093, IL-1094, IL-1095, IL-1096, IL-1097, IL-1098, IL-1099, IL-1100, IL-1101, IL-1102, IL-1103, IL-1104, IL-1105, IL-1106, IL-1107, IL-1108, IL-1109, IL-1110, IL-1111, IL-1112, IL-1113, IL-1114, IL-1115, IL-1116, IL-1117, IL-1118, IL-1119, IL-1120, IL-1121, IL-1122, IL-1123, IL-1124, IL-1125, IL-1126, IL-1127, IL-1128, IL-1129, IL-1130, IL-1131, IL-1132, IL-1133, IL-1134, IL-1135, IL-1136, IL-1137, IL-1138, IL-1139, IL-1140, IL-1141, IL-1142, IL-1143, IL-1144, IL-1145, IL-1146, IL-1147, IL-1148, IL-1149, IL-1150, IL-1151, IL-1152, IL-1153, IL-1154, IL-1155, IL-1156, IL-1157, IL-1158, IL-1159, IL-1160, IL-1161, IL-1162, IL-1163, IL-1164, IL-1165, IL-1166, IL-1167, IL-1168, IL-1169, IL-1170, IL-1171, IL-1172, IL-1173, IL-1174, IL-1175, IL-1176, IL-1177, IL-1178, IL-1179, IL-1180, IL-1181, IL-1182, IL-1183, IL-1184, IL-1185, IL-1186, IL-1187, IL-1188, IL-1189, IL-1190, IL-1191, IL-1192, IL-1193, IL-1194, IL-1195, IL-1196, IL-1197, IL-1198, IL-1199, IL-1200, IL-1201, IL-1202, IL-1203, IL-1204, IL-1205, IL-1206, IL-1207, IL-1208, IL-1209, IL-1210, IL-1211, IL-1212, IL-1213, IL-1214, IL-1215, IL-1216, IL-1217, IL-1218, IL-1219, IL-1220, IL-1221, IL-1222, IL-1223, IL-1224, IL-1225, IL-1226, IL-1227, IL-1228, IL-1229, IL-1230, IL-1231, IL-1232, IL-1233, IL-1234, IL-1235, IL-1236, IL-1237, IL-1238, IL-1239, IL-1240, IL-1241, IL-1242, IL-1243, IL-1244, IL-1245, IL-1246, IL-1247, IL-1248, IL-1249, IL-1250, IL-1251, IL-1252, IL-1253, IL-1254, IL-1255, IL-1256, IL-1257, IL-1258, IL-1259, IL-1260, IL-1261, IL-1262, IL-1263, IL-1264, IL-1265, IL-1266, IL-1267, IL-1268, IL-1269, IL-1270, IL-1271, IL-1272, IL-1273, IL-1274, IL-1275, IL-1276, IL-1277, IL-1278, IL-1279, IL-1280, IL-1281, IL-1282, IL-1283, IL-1284, IL-1285, IL-1286, IL-1287, IL-1288, IL-1289, IL-1290, IL-1291, IL-1292, IL-1293, IL-1294, IL-1295, IL-1296, IL-1297, IL-1298, IL-1299, IL-1300, IL-1301, IL-1302, IL-1303, IL-1304, IL-1305, IL-1306, IL-1307, IL-1308, IL-1309, IL-1310, IL-1311, IL-1312, IL-1313, IL-1314, IL-1315, IL-1316, IL-1317, IL-1318, IL-1319, IL-1320, IL-1321, IL-1322, IL-1323, IL-1324, IL-1325, IL-1326, IL-1327, IL-1328, IL-1329, IL-1330, IL-1331, IL-1332, IL-1333, IL-1334, IL-1335, IL-1336, IL-1337, IL-1338, IL-1339, IL-1340, IL-1341, IL-1342, IL-1343, IL-1344, IL-1345, IL-1346, IL-1347, IL-1348, IL-1349, IL-1350, IL-1351, IL-1352, IL-1353, IL-1354, IL-1355, IL-1356, IL-1357, IL-1358, IL-1359, IL-1360, IL-1361, IL-1362, IL-1363, IL-1364, IL-1365, IL-1366, IL-1367, IL-1368, IL-1369, IL-1370, IL-1371, IL-1372, IL-1373, IL-1374, IL-1375, IL-1376, IL-1377, IL-1378, IL-1379, IL-1380, IL-1381, IL-1382, IL-1383, IL-1384, IL-1385, IL-1386, IL-1387, IL-1388, IL-1389, IL-1390, IL-1391, IL-1392, IL-1393, IL-1394, IL-1395, IL-1396, IL-1397, IL-1398, IL-1399, IL-1400, IL-1401, IL-1402, IL-1403, IL-1404, IL-1405, IL-1406, IL-1407, IL-1408, IL-1409, IL-1410, IL-1411, IL-1412, IL-1413, IL-1414, IL-1415, IL-1416, IL-1417, IL-1418, IL-1419, IL-1420, IL-1421, IL-1422, IL-1423, IL-1424, IL-1425, IL-1426, IL-1427, IL-1428, IL-1429, IL-1430, IL-1431, IL-1432, IL-1433, IL-1434, IL-1435, IL-1436, IL-1437, IL-1438, IL-1439, IL-1440, IL-1441, IL-1442, IL-1443, IL-1444, IL-1445, IL-1446, IL-1447, IL-1448, IL-1449, IL-1450, IL-1451, IL-1452, IL-1453, IL-1454, IL-1455, IL-1456, IL-1457, IL-1458, IL-1459, IL-1460, IL-1461, IL-1462, IL-1463, IL-1464, IL-1465, IL-1466, IL-1467, IL-1468, IL-1469, IL-1470, IL-1471, IL-1472, IL-1473, IL-1474, IL-1475, IL-1476, IL-1477, IL-1478, IL-1479, IL-1480, IL-1481, IL-1482, IL-1483, IL-1484, IL-1485, IL-1486, IL-1487, IL-1488, IL-1489, IL-1490, IL-1491, IL-1492, IL-1493, IL-1494, IL-1495, IL-1496, IL-1497, IL-1498, IL-1499, IL-1500, IL-1501, IL-1502, IL-1503, IL-1504, IL-1505, IL-1506, IL-1507, IL-1508, IL-1509, IL-1510, IL-1511, IL-1512, IL-1513, IL-1514, IL-1515, IL-1516, IL-1517, IL-1518, IL-1519, IL-1520, IL-1521, IL-1522, IL-1523, IL-1524, IL-1525, IL-1526, IL-1527, IL-1528, IL-1529, IL-1530, IL-1531, IL-1532, IL-1533, IL-1534, IL-1535, IL-1536, IL-1537, IL-1538, IL-1539, IL-1540, IL-1541, IL-1542, IL-1543, IL-1544, IL-1545, IL-1546, IL-1547, IL-1548, IL-1549, IL-1550, IL-1551, IL-1552, IL-1553, IL-1554, IL-1555, IL-1556, IL-1557, IL-1558, IL-1559, IL-1560, IL-1561, IL-1562, IL-1563, IL-1564, IL-1565, IL-1566, IL-1567, IL-1568, IL-1569, IL-1570, IL-1571, IL-1572, IL-1573, IL-1574, IL-1575, IL-1576, IL-1577, IL-1578, IL-1579, IL-1580, IL-1581, IL-1582, IL-1583, IL-1584, IL-1585, IL-1586, IL-1587, IL-1588, IL-1589, IL-1590, IL-1591, IL-1592, IL-1593, IL-1594, IL-1595, IL-1596, IL-1597, IL-1598, IL-1599, IL-1600, IL-1601, IL-1602, IL-1603, IL-1604, IL-1605, IL-1606, IL-1607, IL-1608, IL-1609, IL-1610, IL-1611, IL-1612, IL-1613, IL-1614, IL-1615, IL-1616, IL-1617, IL-1618, IL-1619, IL-1620, IL-1621, IL-1622, IL-1623, IL-1624, IL-1625, IL-1626, IL-1627, IL-1628, IL-1629, IL-1630, IL-1631, IL-1632, IL-1633, IL-1634, IL-1635, IL-1636, IL-1637, IL-1638, IL-1639, IL-1640, IL-1641, IL-1642, IL-1643, IL-1644, IL-1645, IL-1646, IL-1647, IL-1648, IL-1649, IL-1650, IL-1651, IL-1652, IL-1653, IL-1654, IL-1655, IL-1656, IL-1657, IL-1658, IL-1659, IL-1660, IL-1661, IL-1662, IL-1663, IL-1664, IL-1665, IL-1666, IL-1667, IL-1668, IL-1669, IL-1670, IL-1671, IL-1672, IL-1673, IL-1674, IL-1675, IL-1676, IL-1677, IL-1678, IL-1679, IL-1680, IL-1681, IL-1682, IL-1683, IL-1684, IL-1685, IL-1686, IL-1687, IL-1688, IL-1689, IL-1690, IL-1691, IL-1692, IL-1693, IL-1694, IL-1695, IL-1696, IL-1697, IL-1698, IL-1699, IL-1700, IL-1701, IL-1702, IL-1703, IL-1704, IL-1705, IL-1706, IL-1707, IL-1708, IL-1709, IL-1710, IL-1711, IL-1712, IL-1713, IL-1714, IL-1715, IL-1716, IL-1717, IL-1718, IL-1719, IL-1720, IL-1721, IL-1722, IL-1723, IL-1724,

incremento o extensión de supervivencia global o reducción de toxicidad.

Definiciones

5 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece la invención. Aunque pueden utilizarse en la práctica para probar la presente invención cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento, se describen los materiales y métodos preferidos en el presente documento. En la descripción y reivindicaciones de la presente invención, se utilizará la siguiente terminología.

Se entenderá también que la terminología utilizada en el presente documento tiene la finalidad únicamente de describir casos particulares y no se pretende que sea limitante.

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

El término "aproximadamente", como se utiliza en el presente documento, cuando se refiere a un valor cuantificable tal como una cantidad, una duración temporal y similares, se entiende que comprende variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, en algunos casos $\pm 5\%$, en algunos casos $\pm 1\%$ y en algunas realizaciones $\pm 0,1\%$ del valor especificado, dado que dichas variaciones son adecuadas para realizar los métodos desvelados.

"Activación", como se utiliza en el presente documento, se refiere al estado de un linfocito T que se ha estimulado suficientemente para inducir proliferación celular detectable. La activación puede asociarse también con la producción de citocinas inducidas y funciones efectoras detectables. La expresión "linfocitos T activados" se refiere a, entre otras cosas, linfocitos T que están experimentando división celular.

En el presente documento se utilizan "activadores" o "agonistas" de un factor soluble para referirse a moléculas o agentes capaces de activar o elevar los niveles del factor soluble. Los activadores son compuestos que incrementan, promueven, inducen activación, activan o regulan al alza la actividad o expresión del factor soluble, por ejemplo, los agonistas. Entre los ensayos para detectar activadores se incluyen, por ejemplo, la expresión del factor soluble *in vitro*, en células o membranas celulares, la aplicación de supuestos compuestos agonistas y seguidamente, la determinación de los efectos funcionales sobre la actividad del factor soluble, tal como se describe en otras partes del presente documento.

El término "anticuerpo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y pueden ser partes inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos son a menudo tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos en la presente divulgación pueden existir en una variedad de formas, entre las que se incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, Fv, Fab y F(ab)₂, así como anticuerpos monocatenarios y anticuerpos humanizados (Harlow et al., 1999, En: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York; Harlow et al., 1989, En: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426).

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')₂ y fragmentos de Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de scFv y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

El término "antígeno" o "Ag", como se utiliza en el presente documento, se define como una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. La respuesta inmunitaria puede implicar la producción de anticuerpos o la activación de células competentes inmunitarias específicas o ambas. El experto en la materia entenderá que cualquier macromolécula, incluyendo virtualmente todas las proteínas o péptidos, pueden servir como un antígeno. Adicionalmente, los antígenos pueden derivarse de ADN recombinante o genómico. Un experto en la materia entenderá que cualquier ADN, que comprende unas secuencias de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos parcial que codifica una proteína que provoca una respuesta inmunitaria, por tanto, codifica un "antígeno" tal como ese término se utiliza en el presente documento. Adicionalmente, un experto en la materia entenderá que un antígeno no tiene que ser codificado exclusivamente por la longitud completa de una secuencia de nucleótidos de un gen. Es fácilmente apreciable que la presente divulgación incluye, pero no se limita a, al uso de secuencias de nucleótidos parciales o más de un gen y que esas secuencias de nucleótidos se organizan en diferentes combinaciones para provocar la respuesta inmunitaria deseada. Por otra parte, un experto en la materia entenderá que un antígeno no necesita que venga codificado por un "gen" en absoluto. Es fácilmente apreciable que un antígeno se puede generar, sintetizar o derivarse de una muestra biológica. Tal muestra biológica puede incluir, pero no se limita a una muestra de tejido, una muestra de tumor, una célula o un fluido biológico.

El término "autoantígeno" significa, según la presente divulgación, cualquier autoantígeno que se reconoce por el sistema inmunitario como si fuera extraño. Los autoantígenos comprenden, pero no se limitan a, proteínas celulares, fosfoproteínas, proteínas de superficies celulares, lípidos celulares, ácidos nucleicos, glucoproteínas, incluyendo los receptores de superficie celular.

5 La expresión "enfermedad autoinmune", como se utiliza en el presente documento, se define como un trastorno resultante de una respuesta autoinmunitaria. Una enfermedad autoinmune es el resultado de una respuesta inapropiada y excesiva ante un autoantígeno. Entre los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias se incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Addison, alopecia, espondilitis anquilosante, hepatitis autoinmunitaria, parotiditis autoinmunitaria, enfermedad de Crohn, diabetes (tipo I), epidermólisis ampollosa distrófica, epididimitis, 10 glomerulonefritis, enfermedad de Grave, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia grave, pénfigo vulgar, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, espondiloartropatías, tiroiditis, vasculitis, vitíligo, mixedema, anemia perniciosa, colitis ulcerosa, entre otros.

15 Como se utiliza en el presente documento, el término "autólogo" quiere decir que se refiere a cualquier material derivado del mismo individuo, el cual se va a reintroducir en el individuo.

"Alogénico" se refiere a un injerto derivado de un animal diferente de la misma especie.

20 "Xenogénico" se refiere a un injerto derivado de un animal de diferente especie.

El término "cáncer", como se usa en el presente documento, se define como una enfermedad caracterizada por el crecimiento rápido e incontrolado de células aberrantes. Las células cancerosas pueden diseminarse localmente o a 25 través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. Entre los ejemplos de diversos cánceres se incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer cerebral, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y similares.

30 Como se utiliza en el presente documento, por "terapia de combinación" se entiende que un primer agente se administra junto con otro agente. "Junto con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento, además de otra modalidad de tratamiento. Como tal, "junto con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento antes, durante o después de la otra modalidad de tratamiento al individuo. Se considera que dichas combinaciones son parte de un único régimen de tratamiento o régimen.

35 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "administración concurrente" significa que la administración de la primera terapia y que la de la segunda terapia en una terapia de combinación se solapan entre sí.

"Ligando coestimulante" como se usa el término en el presente documento, incluye una molécula sobre una célula 40 presentadora de antígeno (por ejemplo, un aAPC, célula dendrítica, linfocito B y similares) que específicamente se une a una molécula coestimulante cognada sobre un linfocito T, proporcionando de este modo una señal la cual, además de la señal primaria proporcionada mediante, por ejemplo, la unión de un complejo de TCR/CD3 con una molécula del MHC cargada con péptido, media en una respuesta de linfocitos T, incluyendo, pero sin limitarse a, proliferación, activación, diferenciación y similares. Un ligando coestimulante puede incluir, pero no se limita a, CD7, 45 B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulante inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor de linfotóxina beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, un agonista o anticuerpo que se une con el receptor de ligando Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3. Un ligando coestimulante también abarca, entre otros, un anticuerpo que se une específicamente con una molécula coestimulante presente en un linfocito T, tal como, pero sin limitarse a, CD27, 50 CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno-1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83.

Una "molécula coestimulante" se refiere al compañero de unión cognado sobre un linfocito T que se une específicamente con un ligando coestimulante, mediando así en una respuesta coestimulante mediante el linfocito T, 55 tal como, pero sin limitarse a, proliferación. Entre las moléculas coestimulantes se incluyen, pero sin limitarse a, una molécula del MHC de clase I, BTLA y receptor de ligando Toll.

Una "señal coestimulante", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una señal, la cual junto con una señal primaria, tal como la ligadura TCR/CD3, conduce a la proliferación de linfocitos T y/o regulación al alza o a la 60 baja de moléculas clave.

Una "enfermedad" es un estado de salud de un animal en el que el animal no puede mantener la homeostasis y en el que se la enfermedad no se mitiga seguidamente la salud del animal sigue deteriorándose. Por contra, un "trastorno" en un animal es un estado de salud en el que el animal es capaz de mantener la homeostasis, pero en el que el estado 65 de salud del animal es menos favorable de lo que sería en ausencia del trastorno. Si se deja sin tratar, un trastorno no causa necesariamente un deterioro adicional en el estado de salud del animal.

La expresión "cantidad eficaz", como se utiliza en el presente documento, significa una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico o profiláctico.

- 5 Como se utiliza en el presente documento, "endógeno" se refiere a cualquier material del organismo o producido en su interior, célula, tejido o sistema.

Como se utiliza en el presente documento, el término "exógeno" se refiere a cualquier material introducido en un organismo, célula, tejido o sistema que se produjo fuera del organismo, célula, tejido o sistema.

- 10 El término "expresión", como se utiliza en el presente documento, se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos particular dirigida por su promotor.

- 15 Un "vector de expresión" se refiere a un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de la expresión ligadas operativamente a una secuencia de nucleótidos que ha de expresarse. Un vector de expresión comprende suficientes elementos de acción cis para la expresión; la célula hospedadora puede suministrar otros elementos para la expresión o pueden suministrarse en un sistema de expresión *in vitro*. Entre los vectores de expresión se incluyen todos aquellos conocidos en la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus (por ejemplo, lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.

- 20 "Homólogo" se refiere a la similitud de secuencia o la identidad de secuencia entre dos polipéptidos o entre dos moléculas de ácidos nucleicos. Cuando una posición en ambas secuencias comparadas se ocupa por la misma subunidad monomérica de base o de aminoácido, por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN se ocupa por adenina, las moléculas así son homólogas en esa posición. El porcentaje de homología entre dos secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las dos secuencias, divididas por el número de posiciones comparadas X 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias son coincidentes u homólogas, las dos secuencias son así homólogas al 60 %. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN ATTGCC y TATGGC comparten el 50 % de homología. Normalmente, se hace una comparación cuando dos secuencias se alinean para proporcionar la máxima homología.

- 25 El término "inmunoglobulina" o "Ig", como se utiliza en el presente documento, se define como una clase de proteínas, que funcionan como anticuerpos. Algunas veces, se hace referencia a los anticuerpos expresados por linfocitos B como el BCR (receptor de linfocitos B; del inglés, B Cell Receptor) o receptor de antígeno. Los cinco miembros incluidos en esta clase de proteínas son IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. IgA es el anticuerpo primario que presente en secreciones corporales, tales como saliva, lágrimas, leche materna, secreciones gastrointestinales y secreciones mucosas de los tractos respiratorios y genitourinarios. La IgG es el anticuerpo en circulación más común. La IgM es la inmunoglobulina principal producida en la respuesta inmunitaria primaria en la mayoría de los sujetos. Es la inmunoglobulina más eficaz en la aglutinación, fijación de complemento y otras respuestas de anticuerpos y es importante en la defensa contra bacterias y virus. La IgD es la inmunoglobulina que tiene una función como anticuerpo no conocida, pero puede servir como un receptor de antígeno. La IgE es la inmunoglobulina que media en la hipersensibilidad inmediata provocando la liberación de mediadores de mastocitos y basófilos después de la exposición a un alérgeno.

- 30 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "respuesta inmunitaria" incluye respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T y/o mediadas por linfocitos B. Entre las respuestas inmunitarias se incluyen las respuestas de linfocitos T, por ejemplo, producción de citocinas y citotoxicidad celular. Además, la expresión respuesta inmunitaria incluye respuestas inmunitarias, que son efectuadas mediante la activación de linfocitos T, por ejemplo, producción de anticuerpos (respuestas humorales) y la activación de células sensibles a citocinas, por ejemplo, macrófagos. Entre las células inmunitarias implicadas en la respuesta inmunitaria se incluyen linfocitos, tales como los linfocitos B y los linfocitos T (CD4+, CD8+, células Th1 y Th2); células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células presentadoras de antígeno profesionales tales como células dendríticas, macrófagos, linfocitos B, células de Langerhans y células presentadoras de antígeno no profesionales tales como queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos, oligodendrocitos); linfocitos citolíticos naturales; células mieloides, tales como macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos.

- 35 Se utilizan "inhibidores" o "antagonistas" en el presente documento para referirse a moléculas o agentes capaces de inhibir, desactivar o reducir los niveles del factor soluble. Los inhibidores son compuestos que, por ejemplo, se unen a, bloquean actividad parcial o totalmente, disminuyen, previenen, retrasan la activación, inactivan, insensibilizan o regulan a la baja la actividad o expresión de un factor soluble, por ejemplo, antagonistas. Entre los inhibidores se incluyen polipéptidos, tales como anticuerpos, receptores solubles y similares, así como inhibidores de ácidos nucleicos tales como ARNip o un ARN antisentido, versiones modificadas genéticamente del factor soluble, por ejemplo, versiones con actividad alterada, así como antagonistas del factor soluble presentes en la naturaleza o sintéticos, moléculas químicas pequeñas y similares. Entre los ensayos para detectar inhibidores se incluyen, por ejemplo, la expresión del factor soluble *in vitro*, en células o membranas celulares, la aplicación de supuestos compuestos antagonistas y seguidamente, la determinación de los efectos funcionales sobre la actividad del factor soluble, tal como se describe en otras partes del presente documento.

Como se utiliza en el presente documento, un "material instructivo" incluye una publicación, una grabación, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que pueda utilizarse para comunicar la utilidad de las composiciones y usos de la invención. El material instructivo del kit de la divulgación puede, por ejemplo, adherirse a un envase que contiene un ácido nucleico, péptido y/o composición de la invención o enviarse junto con un envase que contenga el ácido nucleico, péptido y/o composición. Como alternativa, el material instructivo puede enviarse separadamente del envase con la intención de que el material instructivo y el compuesto se utilicen conjuntamente por el receptor.

"Aislado" significa alterado o eliminado con respecto al estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido presente de forma natural en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico o péptido separado parcial o totalmente de materiales que coexisten en su estado natural, está "aislado". Un ácido nucleico aislado o proteína puede existir en forma sustancialmente purificada o puede existir en un ambiente no nativo tal como, por ejemplo, una célula hospedadora.

Un "lentivirus", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un género de la familia Retroviridae. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus, en cuanto a que son capaces de infectar células que no están en división; pueden suministrar una cantidad considerable de información genética en el ADN de la célula hospedadora, de manera que constituyen uno de los métodos más eficaces de entrega de gen por un vector. El VIH, el VIS y el VIF, son ejemplos de lentivirus. Los vectores derivados de lentivirus ofrecen los medios para alcanzar niveles sustanciales de transferencia génica *in vivo*.

La expresión "nivel de un factor soluble" en una muestra biológica, como se utiliza en el presente documento, se refiere típicamente a la cantidad de proteína, fragmento proteico o niveles peptídicos del factor soluble que está presente en una muestra biológica. Un "nivel de factor soluble" no es necesario que se cuantifique, simplemente que se detecte, por ejemplo, una detección subjetiva, visual por un ser humano, con o sin la comparación con un nivel de una muestra de control o un nivel esperado de una muestra de control.

La expresión "que modula", como se utiliza en el presente documento, significa que media un incremento o descenso detectable en el nivel de una respuesta en un sujeto, en comparación con el nivel de una respuesta en el sujeto en la ausencia de un tratamiento o compuesto y/o en comparación con el nivel de una respuesta en un sujeto de otra manera idéntico, pero sin tratamiento. La expresión abarca perturbar y/o afectar a una señal nativa o respuesta, mediando así una respuesta terapéutica beneficiosa en un sujeto, preferentemente, un ser humano.

La administración "parenteral" de una composición inmunogénica de una composición incluye, por ejemplo, una inyección subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) o intraesternal o técnicas de infusión.

Los términos "paciente", "sujeto", "individuo", y similares se utilizan en el presente documento de forma intercambiable y se refieren a cualquier animal o células del mismo ya sea *in vitro* o *in situ*, susceptibles de los métodos descritos en el presente documento. En ciertos casos, no limitantes, el paciente, sujeto o individuo, es un ser humano.

La expresión "administración simultánea", como se utiliza en el presente documento, significa que una primera terapia y una segunda terapia en una terapia de combinación se administran con una separación temporal de no más de aproximadamente 15 minutos, tal como no más de aproximadamente 10, 5 o 1 minuto. Cuando la primera y la segunda terapia se administran simultáneamente, la primera y la segunda terapia pueden estar contenidas en la misma composición (por ejemplo, una composición que comprende tanto una primera como una segunda terapia) o en composiciones separadas (por ejemplo, una primera terapia en una composición y otra composición contiene una segunda terapia).

La expresión "administración simultánea", como se utiliza en el presente documento, significa que una primera terapia y una segunda terapia en una terapia de combinación se administran con una separación temporal de no más de aproximadamente 15 minutos, tal como no más de aproximadamente 10, 5 o 1 minuto. Cuando la primera y la segunda terapia se administran simultáneamente, la primera y la segunda terapia pueden estar contenidas en la misma composición (por ejemplo, una composición que comprende tanto una primera como una segunda terapia) o en composiciones separadas (por ejemplo, una primera terapia en una composición y otra composición contiene una segunda terapia).

La expresión "se une específicamente", como se usa en el presente documento con respecto a un anticuerpo, se entiende como un anticuerpo que reconoce un antígeno específico, pero no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas de una muestra. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de una especie, puede unirse también a ese antígeno de una o más especies. Pero, tal reactividad cruzada entre especies no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En otro ejemplo, un anticuerpo que específicamente se une a un antígeno, puede unirse también a diferentes formas alélicas del antígeno. Sin embargo, tal reactividad cruzada no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En algunos casos, las expresiones "unión específica" o "específicamente unido", pueden utilizarse en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, en el sentido de que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o epítipo) sobre la especie

química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica, normalmente más que a proteínas. Si un anticuerpo es específico para el epítipo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o A libre, sin marcar), en una reacción que contiene el "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A unido al anticuerpo.

Por el término "estimulación", se entiende una respuesta primaria inducida mediante la unión de una molécula estimuladora (por ejemplo, un complejo TCR/CD3) con su ligando cognado mediando así un evento de transducción de señal, tal como, pero sin limitarse a, la transducción de señal vía el complejo de TCR/CD3. La estimulación puede mediar la expresión alterada de ciertas moléculas, tales como la regulación a la baja de TGF- β y/o la reorganización de estructuras del citoesqueleto y similares.

Una "molécula estimuladora", como se usa el término en el presente documento, significa una molécula sobre un linfocito T que se une específicamente con un ligando estimulador cognado presente sobre una célula presentadora de antígeno.

Un "ligando estimulador", como se utiliza en el presente documento, significa un ligando que cuando se presenta sobre una célula presentadora de antígeno (por ejemplo, un aAPC, una célula dendrítica, un linfocito B y similares) puede unirse específicamente con un socio de unión cognado (referido en el presente documento como "molécula estimuladora") sobre un linfocito T, mediando así una respuesta primaria mediante el linfocito T, incluyendo, pero sin limitarse a, activación, iniciación de una respuesta inmunitaria, proliferación y similares. Se conocen bien en la técnica los ligandos estimuladores y abarcan, entre otros, una molécula CMH de clase I cargada con un péptido, un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo superagonista anti-CD28 y un anticuerpo superagonista anti-CD2.

El término "sujeto" tiene por objeto incluir organismos vivos en los cuales se puede eliminar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, mamíferos). Entre los ejemplos de sujetos se incluyen humanos, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de los mismos.

Como se utiliza en el presente documento, una célula "purificada sustancialmente" es una célula que queda esencialmente libre de otros tipos de células. Una célula purificada sustancialmente también se refiere a una célula que se ha separado de otros tipos de células, con las cuales se asocian normalmente en su estado natural. En algunos casos, una población de células purificadas sustancialmente se refiere a una población homogénea de células. En otros casos, esta expresión se refiere simplemente a células que se han separado de las células con las que están naturalmente asociadas en su estado natural. En algunos casos, las células se cultivan *in vitro*. En otros casos, las células no se cultivan *in vitro*.

El término "terapéutico", como se utiliza en el presente documento, significa un tratamiento y/o profilaxis. Un efecto terapéutico se obtiene mediante supresión, remisión o erradicación de una patología.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de compuesto de la invención que eliminará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema o sujeto bajo la observación del investigador, veterinario, doctor en medicina u otro especialista clínico. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" incluye aquella cantidad de un compuesto que, cuando se administra, es suficiente para evitar el desarrollo o aliviar hasta cierto punto, uno o más de los signos o síntomas del trastorno o enfermedad tratada. La cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del compuesto, la enfermedad y su gravedad y la edad, peso, etc., del sujeto que se va a tratar.

Un "trasplante", como se utiliza en el presente documento, se refiere a células, tejido o un órgano que se introduce en un individuo. La fuente del material trasplantado puede ser células cultivadas, células de otro individuo o células del mismo individuo (por ejemplo, después de que las células se cultiven *in vitro*). Trasplantes de órganos ejemplares son riñón, hígado, corazón, pulmón y páncreas.

"Tratar" una enfermedad, como se usa el término en el presente documento, significa reducir la frecuencia o severidad de al menos un signo o síntoma de una enfermedad o trastorno experimentado por un sujeto.

El término "transfectado" o "transformado" o "transducido", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un proceso por el cual se transfiere o introduce ácido nucleico exógeno en la célula hospedadora. Una célula "transfectada" o "transformada" o "transducida" es una que ha sido transfectada, transformada o transducida con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula sujeto primaria y su progenie.

Intervalos: a lo largo de esta divulgación, se pueden presentar diversos aspectos de la invención en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es únicamente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible sobre el alcance de la invención. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha desvelado específicamente todos los posibles subintervalos, así como valores numéricos individuales dentro ese intervalo. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 tiene subintervalos desvelados específicamente, tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Descripción

- La presente invención proporciona composiciones y usos de las mismas para tratar el cáncer en un paciente como se define en las reivindicaciones adjuntas. En un caso, el método de tratamiento comprende una primera línea de terapia que comprende administrar el CAR de la divulgación al paciente para inducir una respuesta inmunitaria antitumoral y monitorizar los niveles de factores solubles en el paciente tras la infusión de linfocitos T, para determinar el tipo de segunda línea de terapia adecuada para tratar al paciente, como consecuencia de la primera línea de terapia.
- En un caso, la segunda línea de terapia comprende la evaluación del perfil de factores solubles en un paciente, tras recibir una infusión del CAR T adecuado (referido en cualquier otro sitio en el presente documento como "tras la infusión de linfocitos T") en la que, cuando el perfil de factor soluble indica un incremento en un factor soluble particular tras la infusión de linfocitos T, en comparación con el previo a la infusión de linfocitos T, un técnico experto puede elegir administrar al paciente que necesita una cantidad eficaz de un compuesto inhibidor de factor soluble, para gestionar los niveles elevados del factor soluble tras la infusión de linfocitos T. Por consiguiente, la segunda línea de terapia en un caso incluye la administración de un tipo de terapia inhibidora de factor soluble para gestionar los niveles elevados de ciertos factores solubles, que resultan de la primera línea de terapia que utiliza linfocitos T de CAR.
- En otro caso más, la segunda línea de terapia referida a la administración al paciente de un compuesto inhibidor de factor soluble se puede combinar con otras terapias convencionalmente utilizadas para tratar, prevenir o gestionar enfermedades o trastornos asociados con o caracterizados por, angiogénesis indeseadas. Entre los ejemplos de tales terapias se incluyen, pero no se limitan a, cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia biológica e inmunoterapia.
- En un caso, el CAR de la divulgación se puede modificar por ingeniería genética para comprender un dominio extracelular que tiene un dominio de unión a antígeno que se dirige al antígeno tumoral fusionado con un dominio de señalización intracelular de la cadena zeta del complejo receptor de antígeno de linfocitos T (por ejemplo, zeta de CD3). Un antígeno de linfocitos B de antígeno tumoral ejemplar es el CD19, porque este antígeno se expresa en linfocitos B malignos. Sin embargo, la invención no se limita a centrarse en CD19. Más bien, la divulgación incluye cualquier fracción de unión a antígeno tumoral. La fracción de unión a antígeno se utiliza preferentemente fusionada con un dominio intracelular de una o más de una molécula coestimulante y una cadena zeta. Preferentemente, la fracción de unión a antígeno se fusiona con uno o más dominios intracelulares seleccionados del grupo de un dominio de señalización CD137 (4-1BB), un dominio de señalización de CD28, un dominio de señal de Cd3zeta y cualquier combinación de los mismos.
- En un caso, el CAR de la divulgación comprende un dominio de señalización CD137 (4-1BB). Esto se debe a que la presente invención está basada parcialmente en el descubrimiento de que las respuestas de linfocitos T mediadas por CAR pueden potenciarse adicionalmente con la adición de dominios coestimuladores. Por ejemplo, la inclusión del dominio de señalización CD137 (4-1BB) incrementó significativamente la actividad mediada por CAR y la persistencia *in vivo* de linfocitos T de CAR, en comparación con un, de otro modo idéntico, linfocito T de CAR para expresar CD137 (4-1BB). Sin embargo, la invención no se limita a un CAR específico. Más bien, en la presente invención, se puede utilizar cualquier CAR que se dirige a un antígeno tumoral. Las composiciones y métodos para hacer y utilizar CAR se han descrito en el documento PCT/US11/64191, que se incorpora en este documento por referencia en su totalidad.
- ### Métodos
- El régimen de tratamiento de la invención da como resultado una reducción cuantificable del tamaño del tumor o evidencia de la enfermedad o progresión de la enfermedad, respuesta completa, respuesta parcial, enfermedad estable, incremento o extensión de la supervivencia libre de progresión, incremento o extensión de supervivencia global o reducción de toxicidad.
- Como parte del régimen de tratamiento global, la invención abarca una terapia de primera línea y una de segunda línea, en la que la terapia de primera línea comprende la administración de un linfocito T de CAR de la divulgación al paciente que lo necesita. El régimen de tratamiento de la invención permite la gestión del cáncer y tratamiento del mismo, mediante la evaluación del perfil de factor soluble en pacientes tras la infusión de linfocitos T. Una terapia de segunda línea adecuada comprende la administración de un inhibidor de factor soluble al paciente para reducir los niveles elevados de factor soluble que resultan de la terapia de primera línea. En algunos casos, la terapia de segunda línea adecuada comprende la administración de un activador de factor soluble adecuado al paciente para incrementar los niveles suprimidos del factor soluble que resulta de la terapia de primera línea.
- En un caso, una terapia de segunda línea adecuada comprende la administración de un inhibidor de citocina al paciente para reducir los niveles elevados de citocina que resultan de la terapia de primera línea. En algunos casos, la terapia de segunda línea adecuada comprende la administración de un activador de citocina adecuado al paciente para incrementar los niveles suprimidos de la citocina que resulta de la terapia de primera línea.
- En un caso, los niveles diferenciales se encuentran sobreexpresados (expresión elevada) o subexpresados (expresión

baja) en comparación con el nivel de expresión de una célula normal o de control, una población de pacientes dada o con un control interno. En algunos casos, los niveles se comparan entre el paciente y un individuo normal, entre tras la infusión de linfocitos T y previos a la infusión de linfocitos T al paciente o entre tras la infusión de linfocitos T al paciente y un primer punto temporal y un segundo punto temporal.

En un caso, la divulgación incluye la evaluación de niveles diferenciales de una o más citocinas para generar un perfil de citocinas en un paciente tras la infusión de linfocitos T para determinar el tipo de terapia de citocina a aplicar al paciente, con el fin de regular el nivel de citocina volviendo a niveles normales. Por tanto, la divulgación puede aplicarse a la identificación de niveles de citocina elevados, como resultado de la presencia de linfocitos T de CAR de la divulgación en el paciente, que permite el tratamiento especializado del paciente con inhibidores de citocinas para reducir los niveles elevados de la citocina. En otro caso, la divulgación puede aplicarse a la identificación de niveles de citocina reducidos como resultado de la presencia de linfocitos T de CAR de la divulgación en el paciente, que permite el tratamiento especializado del paciente con activadores de citocinas para incrementar los niveles reducidos de la citocina.

En un caso, los niveles de citocinas que se han elevado como resultado de recibir una infusión de linfocitos T de CAR incluyen, pero no se limitan a IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-2R, IFN- α , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, TNF α , GM-CSF, G-CSF, CXCL9, CXCL10, factores CXCR, VEGF, RANTES, EOTAXINA, EGF, HGF, FGF- β , CD40, CD40L, ferritina y similares. Sin embargo, la divulgación no debe limitarse a estas citocinas mencionadas. Más bien, la divulgación incluye cualquier citocina identificada como elevada en un paciente como resultado de recibir una infusión de linfocitos T de CAR.

En un caso, los niveles de citocinas que han disminuido como resultado de recibir una infusión de linfocitos T de CAR incluyen, pero no se limitan a IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-2R, IFN- α , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, TNF α , GM-CSF, G-CSF, CXCL9, CXCL10, factores CXCR, VEGF, RANTES, EOTAXINA, EGF, HGF, FGF- β , CD40, CD40L, ferritina y similares. Sin embargo, la divulgación no debe limitarse a estas citocinas mencionadas. Más bien, la divulgación incluye cualquier citocina identificada como reducida en un paciente como resultado de recibir una infusión de linfocitos T de CAR.

Detección de una citocina y tratamiento de la misma

Aunque esta sección describe la detección de una citocina y el tratamiento de la misma como parte de la terapia de segunda línea, la divulgación abarca la detección de cualquier factor soluble y tratamiento del mismo como parte de la terapia de segunda línea. Por tanto, la descripción en el contexto de una "citocina" puede aplicarse igualmente a un "factor soluble".

En un caso, como parte de la terapia de segunda línea, la divulgación incluye métodos para detectar niveles de una citocina en un paciente que ha recibido infusión de un linfocito T de CAR de la divulgación. En algunos casos, la presencia o nivel de una citocina puede utilizarse para seleccionar un tratamiento candidato. En algunos otros casos, la presencia o niveles de la citocina se pueden utilizar para determinar el éxito durante el curso o después del tratamiento de la primera línea, segunda línea o ambas primera y segunda línea de terapia.

Entre las muestras biológicas en las cuales se puede detectar la citocina se incluye, por ejemplo, el suero. En algunos casos, las muestras biológicas incluyen una biopsia de tejido que puede tener o no un componente líquido.

Se pueden utilizar inmunoensayos para analizar cuantitativa o cualitativamente los niveles de citocinas en una muestra biológica. Se puede encontrar una visión general de la tecnología aplicable en numerosos manuales fácilmente disponibles, por ejemplo, Harlow y Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Using Antibodies: A Laboratory Manual (1999).

Además de utilizar inmunoensayos para detectar los niveles de citocinas en una muestra biológica de un paciente, se puede evaluar la expresión y los niveles de citocinas basándose en el nivel de expresión génica de las citocinas particulares. Se conocen bien las técnicas de hibridación de ARN para determinar la presencia y/o nivel de expresión de ARNm por los expertos en la materia y se pueden utilizar para evaluar la presencia o el nivel de expresión génica de la citocina de interés.

En algunos casos, los métodos de la presente divulgación utilizan socios de unión selectiva de la citocina para identificar la presencia o determinar los niveles de la citocina en una muestra biológica. El socio de unión selectiva a utilizar con los métodos y kits de la presente divulgación puede ser, por ejemplo, un anticuerpo. En algunos aspectos, se pueden utilizar los anticuerpos monoclonales de la citocina particular. En algunos otros aspectos, se pueden emplear anticuerpos policlonales de la citocina particular para poner en práctica los métodos y en los kits de la presente divulgación.

Se encuentran disponibles y se pueden utilizar anticuerpos comerciales de la citocina con los métodos y kits de la presente divulgación. Se conoce bien por los expertos en la materia que el tipo, fuente y otros aspectos de un anticuerpo a utilizar, es una consideración que ha de hacerse a la luz del ensayo en el cual se utiliza el anticuerpo. En

algunos casos, los anticuerpos que reconocerán su antígeno diana en una transferencia de Western pueden no ser aplicables a un ensayo ELISA o ELISpot y viceversa.

En algunos casos, los anticuerpos a utilizar para los ensayos de la presente divulgación se pueden producir utilizando técnicas para producir anticuerpos monoclonales o policlonales que se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow y Lane, citado anteriormente; Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed. 1986); y Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975). Tales técnicas incluyen la preparación de anticuerpos mediante la selección de anticuerpos de librerías de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, así como la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales mediante inmunización de conejos o ratones (véase, por ejemplo, Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989); Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989)). Tales anticuerpos pueden utilizarse para aplicaciones de diagnóstico, por ejemplo, en el tratamiento y/o detección de cualquiera de las enfermedades asociadas a citocinas o afecciones específicas descritas en el presente documento.

Los métodos de detección que emplean inmunoensayos son particularmente adecuados para la práctica en el punto de atención del paciente. Tales métodos permiten la evaluación inmediata de diagnóstico y/o pronóstico del paciente. Se describen sistemas de diagnóstico del punto de atención, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 6.267.722. Se encuentran disponibles también otros formatos de inmunoensayo, tales como que una evaluación de la muestra biológica puede realizarse sin tener que enviar la muestra a un laboratorio para su evaluación. Típicamente estos ensayos tienen el formato de ensayos sólidos en el que un reactivo, por ejemplo, un anticuerpo, se utiliza para detectar la citocina. Se describen dispositivos ejemplares de prueba adecuados para utilizar con inmunoensayos, tales como ensayos de la presente divulgación, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N.º 7.189.522; 6.818.455 y 6.656.745.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para la detección de secuencias de polinucleótidos que codifican la citocina en una muestra biológica. Como se observó anteriormente, una "muestra biológica" se refiere a una célula o población de células o una cantidad de tejido o fluido de un paciente. Muy a menudo, la muestra se ha extraído de un paciente, pero el término "muestra biológica" puede referirse también a células o tejidos analizados *in vivo*, es decir, sin extraer del paciente. Típicamente, una "muestra biológica" contendrá células del paciente, pero el término puede referirse también a material biológico no celular.

En un caso, los ensayos basados en amplificación se utilizan para medir el nivel de una citocina deseada. En tal ensayo, las secuencias de ácido nucleico de la citocina deseada actúan como un molde en una reacción de amplificación (por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR; del inglés, Polymerase Chain Reaction). En una amplificación cuantitativa, la cantidad de producto de amplificación será proporcional a la cantidad de molde en la muestra original. La comparación con controles adecuados proporciona una medida del número de copias del gen de citocina asociado. Se conocen bien los métodos de amplificación cuantitativa por los expertos en la materia. Los protocolos para PCR cuantitativa se proporcionan, por ejemplo, en Innis et al. (1990) *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. Nueva York). Los métodos de PCR en tiempo real (PCR-TR; del inglés, Real Time PCR) se conocen bien por los expertos (véase, por ejemplo, Ausubel et al., citado anteriormente). En algunos casos, se utiliza PCR-TR cuantitativa, por ejemplo, un ensayo TaqMan™, permitiendo así la comparación del nivel de ARNm en una muestra con una muestra o valor de control. Las secuencias de ácidos nucleicos conocidas para una citocina deseada son suficientes para permitir a un experto seleccionar rutinariamente cebadores para amplificar cualquier porción del gen. Los cebadores adecuados para la amplificación de secuencias específicas se pueden diseñar utilizando los principios bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Dieffenbach & Dveksler, *PCR Primer: A Laboratory Manual* (1995)).

En algunos casos, pueden utilizarse ensayos basados en hibridación para detectar la cantidad de una citocina deseada en las células de una muestra biológica. Tales ensayos incluyen análisis de dot blot de ARN así como otros ensayos, por ejemplo, hibridación *in situ* fluorescente, los cuales se realizan sobre muestras que comprenden células. En la técnica se dispone fácilmente de otros ensayos de hibridación.

En numerosos casos de la presente divulgación, se detectará el nivel y/o presencia de un polinucleótido o polipéptido de citocina en una muestra biológica, detectando así la expresión diferencial de la citocina para generar un perfil de citocinas de una muestra biológica derivada de un paciente infundido con linfocitos T de CAR de la divulgación en comparación con la muestra biológica de control.

La cantidad de un polinucleótido o polipéptido de citocina detectada en la muestra biológica indica la presencia de una citocina para generar un perfil de citocinas con el fin de clasificar al paciente para el tratamiento de citocinas adecuado. Por ejemplo, cuando el perfil de citocinas indica un incremento en una citocina particular tras la infusión de linfocitos T en comparación con el control (por ejemplo, previo a la infusión de linfocitos T), un experto en la materia puede elegir administrar al paciente que necesita tal gestión una cantidad eficaz de un compuesto inhibidor de citocina. Como alternativa, cuando el perfil de citocinas indica una disminución en una citocina particular tras la infusión de linfocitos T en comparación con el control (por ejemplo, previo a la infusión de linfocitos T), un experto en la materia puede elegir administrar al paciente que necesita tal gestión, una cantidad eficaz de un compuesto activador de citocina.

En algunos casos, la diferencia en los niveles de citocina entre la muestra tras la infusión de linfocitos T y la muestra

de control puede ser de al menos aproximadamente 0,5, 1,0, 1,5, 2, 5, 10, 100, 200, 500, 1000 veces.

Los presentes métodos se pueden utilizar también para evaluar la eficacia del curso de un tratamiento. Por ejemplo, en un paciente tras la infusión de linfocitos T que contiene una elevada cantidad de citocina IL-6, se puede evaluar la

- 5 eficacia de un tratamiento anti-IL-6 monitorizando, a lo largo del tiempo, la IL-6. Por ejemplo, una reducción en los niveles de polinucleótidos o polipéptidos de IL-6 en una muestra biológica de un paciente que sigue un tratamiento, en comparación con el nivel en una muestra tomada del mamífero antes o al comienzo del tratamiento, indica tratamiento eficaz.
- 10 En un caso, un régimen de tratamiento se puede basar en neutralizar la citocina elevada. Por ejemplo, pueden seleccionarse antagonistas de una citocina para el tratamiento. Los anticuerpos son un ejemplo de un antagonista adecuado e incluye anticuerpos de ratón, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos o fragmentos de los mismos. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes de cadena ligera y pesada se han construido, normalmente mediante ingeniería genética, a partir de segmentos génicos de inmunoglobulinas que pertenecen a especies diferentes (véase, por ejemplo, Boyce et al., *Annals of Oncology* 14:520-535 (2003)). Por

- 15 ejemplo, los segmentos variables (V) de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes (C) humanos. Un anticuerpo quimérico típico es por tanto una proteína híbrida que consiste en el V o dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de ratón y el C o regiones efectoras de un anticuerpo humano.

- 20 Los anticuerpos humanizados tienen restos de la región marco variable sustancialmente de un anticuerpo humano (denominado anticuerpo aceptor) y regiones determinantes de la complementariedad sustancialmente de un anticuerpo de ratón (referida como la inmunoglobulina donante). Véanse Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989) y el documento WO 90/07861, patente de EE.UU. n.º 5.693.762, patente de EE.UU. n.º 5.693.761, patente de EE.UU. n.º 5.585.089, patente de EE.UU. n.º 5.530.101 y Winter, patente de EE.UU. n.º 5.225.539. La(s) región(es) constante(s), si está(n) presente(s), procede(n) también sustancial o enteramente de una inmunoglobulina humana. Los anticuerpos pueden obtenerse mediante enfoques de hibridoma convencionales, visualización de fagos (véase, por ejemplo, Dower et al. documento WO 91/17271 y McCafferty et al. documento WO 92/01047), uso de ratones transgénicos con sistemas inmunitarios humanos (Lonberg et al., WO93/12227 (1993)), entre otras fuentes. Se pueden obtener ácidos nucleicos que codifican cadenas de inmunoglobulina de hibridomas o
- 30 líneas celulares que producen anticuerpos o basándose en ácidos nucleicos de inmunoglobulinas o secuencias de aminoácidos de la bibliografía.

Se pueden utilizar también otros antagonistas de una citocina deseada para los propósitos del tratamiento. Por ejemplo, una clase de antagonistas que puede utilizarse para los fines de la presente divulgación, son las formas solubles de los receptores de la citocina. Solo con fines meramente ilustrativos, un antagonista de IL-6 es un anticuerpo anti-IL-6 que se une específicamente a IL-6. Un anticuerpo específico tiene la capacidad de inhibir o antagonizar la acción de IL-6 sistémicamente. En algunos casos, el anticuerpo se une a IL-6 y evita que pueda interactuar o activar sus receptores (por ejemplo, IL-6R α o IL-6R β). En algunos casos, la actividad de IL-6 se puede antagonizar utilizando un antagonista de los receptores de interleucina-6 (IL-6R). El documento EE.UU. 2006/251653 describe métodos para

40 tratar una enfermedad relacionada con interleucina-6 y muestra numerosos antagonistas de interleucina-6, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos humanizados anti-IL-6R y anticuerpos quiméricos anti-IL-6R. En algunos casos, se puede utilizar un derivado de IL-6 o IL-6R para bloquear y antagonizar la interacción entre IL-6/IL-6R.

- 45 La divulgación no se limita a las citocinas y sus correspondientes activadores e inhibidores descritos en el presente documento. Más bien, la divulgación incluye el uso de cualquier citocina activadora y/o inhibidora que se utiliza en la técnica para modular la citocina. Esto se debe a que la invención se basa en la gestión del tratamiento contra el cáncer en un paciente que recibe infusión de linfocitos T de CAR de la divulgación, en la que los linfocitos T de CAR infundidos dan como resultado el incremento y disminución de los niveles de varias citocinas. Un experto en la técnica basándose en la divulgación presentada en el presente documento, que los niveles de expresión diferencial de una citocina en una muestra tras la infusión de linfocitos T en comparación con una muestra de control, se pueden dirigir para tratamiento para tener el nivel de citocina incrementado o disminuido a niveles normales.
- 50

Aplicación terapéutica

- 55 La presente divulgación abarca una célula (por ejemplo, un linfocito T) transducida con un vector lentiviral (VL). Por ejemplo, el VL codifica un CAR que combina un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico con un dominio intracelular de CD3-zeta, CD28, 4-1BB o cualquier combinación de los mismos. Por tanto, en algunos casos, el linfocito T transducido puede provocar una respuesta de linfocitos T mediada por CAR.
- 60 La divulgación proporciona el uso de un CAR para redirigir la especificidad de un linfocito T primario a un antígeno tumoral. Por tanto, la presente divulgación también proporciona un método para estimular una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T hacia una población de células diana o tejido en un mamífero que comprende la etapa de administrar al mamífero un linfocito T que expresa un CAR, en el que el CAR comprende una fracción de unión que interactúa específicamente con una diana predeterminada, una porción de cadena zeta que comprende, por ejemplo,
- 65 el dominio intracelular de CD3zeta humano y una región de señalización coestimuladora.

En un caso, la presente divulgación incluye un tipo de terapia celular en la que los linfocitos T se encuentran genéticamente modificados para expresar un CAR y el linfocito T de CAR se infunde en un receptor que lo necesita. La célula infundida es capaz de matar células tumorales en el receptor. A diferencia de terapias con anticuerpos, los linfocitos T de CAR son capaces de replicarse *in vivo*, resultando una larga permanencia que puede conducir a un control tumoral sostenido.

En un caso, los linfocitos T de CAR de la divulgación pueden someterse a una fuerte expansión de linfocitos T *in vivo* y pueden persistir durante un largo periodo de tiempo. En otro caso, los linfocitos T de CAR de la divulgación evolucionan a linfocitos T de memoria específicos que pueden reactivarse para inhibir cualquier formación de tumor adicional o crecimiento. Por ejemplo, resultó inesperado que las células CART19 de la divulgación pudieran someterse a una fuerte expansión de linfocitos T *in vivo* y persistir en niveles elevados un largo periodo de tiempo en sangre y médula ósea y formar linfocitos T de memoria específicos. Sin intención de adherirse a ninguna teoría en particular, los linfocitos T de CAR pueden diferenciarse *in vivo* en un estado similar a una memoria central hasta el encuentro y la eliminación subsiguiente de células diana que expresan el antígeno sustituto.

Sin intención de adherirse a ninguna teoría en particular, la respuesta inmunitaria antitumoral provocada por los linfocitos T modificados con CAR pueden constituir una respuesta inmunitaria activa o una respuesta inmunitaria pasiva. Además, la respuesta inmunitaria mediada por CAR puede ser parte de un enfoque de inmunoterapia adoptiva en la que los linfocitos T modificados con CAR inducen una respuesta inmunitaria específica a la fracción de unión al antígeno en el CAR. Por ejemplo, unas células CART19 provocan una respuesta inmunitaria específica contra células que expresan CD19.

Si bien los datos desvelados en el presente documento desvelan específicamente un vector lentiviral que comprende el anti-CD 19 scFv derivado del anticuerpo monoclonal murino FMC63, el dominio bisagra y transmembrana humano Cd8 α y los dominios de señalización humanos 4-1BB y CD3zeta, la invención debe interpretarse como que incluye infinidad de variaciones de cada uno de los componentes del constructo según lo descrito en otras partes del presente documento. Es decir, la invención incluye el uso de cualquier fracción de unión a antígeno en el CAR para generar una respuesta de linfocitos T mediados por CAR específica para la fracción de unión a antígeno. Por ejemplo, la fracción de unión a antígeno en el CAR de la divulgación puede dirigirse a un antígeno tumoral con el fin de tratar el cáncer.

Entre los cánceres que pueden tratarse se incluyen los tumores que no se encuentran vascularizados o no vascularizados sustancialmente aún, así como los tumores vascularizados. Los cánceres pueden comprender tumores no sólidos (tales como los tumores hematológicos, por ejemplo, leucemias y linfomas) o pueden comprender tumores sólidos. Los tipos de cánceres que pueden tratarse con los CAR de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, blastoma y sarcoma y ciertas leucemias o tumores malignos linfoides, tumores benignos y malignos y tumores malignos, por ejemplo, sarcomas, carcinomas y melanomas. Se incluyen también los tumores/cánceres de adultos y los tumores/cánceres pediátricos.

Los cánceres hematológicos son cánceres de la sangre o de médula ósea. Entre los ejemplos de cánceres hematológicos (o hematógenos) se incluyen las leucemias, incluidas las leucemias agudas (tales como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (tales como leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (formas indolente y de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de la cadena pesada, síndrome mielodisplásico, leucemia de células pilosas y mielodisplasia.

Los tumores sólidos son masas anormales de tejido que normalmente no contienen quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos. Los diferentes tipos de tumores sólidos se nombran según el tipo de células que los forman (tales como sarcomas, carcinomas y linfomas). Los ejemplos de tumores sólidos, tales como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, osteosarcoma y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, neoplasia maligna linfóide, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cánceres de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, feocromocitomas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga, melanoma y tumores del SNC (tales como glioma (tales como glioma de tronco encefálico y gliomas mixtos), glioblastoma (también conocido como glioblastoma multiforme), astrocitoma, linfoma primario del SNC, germinoma, meduloblastoma, neurilemoma, craneofaringeoma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, neuroblastoma, retinoblastoma y metástasis cerebral).

En un caso, la porción de la fracción de unión a antígeno del CAR de la divulgación se concibe para tratar un cáncer particular. Por ejemplo, el CAR diseñado para dirigirse a CD19 puede utilizarse para tratar cánceres y trastornos que incluyen pero no se limitan a LLA de pre-B (indicación pediátrica), LLA de adultos, linfoma de células del manto, linfoma

difuso de linfocitos B grandes, recuperación tras trasplante de médula ósea alogénico y similares.

En otro caso, puede diseñarse el CAR par dirigirse a CD22 para tratar el linfoma difuso de linfocitos B grandes.

- 5 En un caso, los cánceres y trastornos incluyen pero no se limitan a LLA de pre-B (indicación pediátrica), LLA de adultos, linfoma de células del manto, linfoma difuso de linfocitos B grandes, recuperación tras trasplante de médula ósea alogénico y similares, pueden tratarse usando una combinación de CAR que se dirigen a CD19, CD20, CD22 y ROR1.

- 10 En un caso, el CAR se puede diseñar para dirigirse a mesotelina para tratar mesotelioma, cáncer de páncreas, cáncer de ovario y similares.

En un caso, el CAR se puede diseñar para dirigirse a CD33/IL3Ra para tratar leucemia mielógena aguda y similares.

- 15 En un caso, el CAR se puede diseñar para dirigirse a c-Met para tratar cáncer de mama triple negativo, cáncer de pulmón no microcítico y similares.

En un caso, el CAR se puede diseñar para dirigirse a PSMA para tratar cáncer de próstata y similares.

- 20 En un caso, el CAR se puede diseñar para dirigirse a Glicolípidio F77 para tratar cáncer de próstata y similares.

En un caso, el CAR se puede diseñar para dirigirse a EGFRvIII para tratar glioblastoma y similares.

En un caso, el CAR se puede diseñar para dirigirse a GD-2 para tratar neuroblastoma, melanoma y similares.

- 25 En un caso, el CAR se puede diseñar para dirigirse a NY-ESO-1 TCR para tratar mieloma, sarcoma, melanoma y similares.

- 30 En un caso, el CAR se puede diseñar para dirigirse a MAGE A3 TCR para tratar mieloma, sarcoma, melanoma y similares.

Sin embargo, la invención no debe interpretarse como limitada exclusivamente a las dianas de antígenos y las enfermedades desveladas en el presente documento. Más bien, la divulgación debe interpretarse como que incluye cualquier diana de antígeno que se asocia con una enfermedad en la que un CAR puede utilizarse para tratar la enfermedad.

- 35 Los linfocitos T modificados con CAR de la divulgación pueden servir también como un tipo de vacuna para inmunización *ex vivo* y/o terapia *in vivo* en un mamífero. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

- 40 Con respecto a la inmunización *ex vivo*, al menos un caso de lo siguiente sucede *in vitro* antes de administrar la célula a un mamífero: i) expansión de las células, ii) introducción de un ácido nucleico que codifica un CAR en las células y/o iii) crioconservación de las células.

- 45 Se conocen bien los procedimientos *ex vivo* en la técnica y se debaten más a fondo a continuación. En resumen, las células se aíslan de un mamífero (preferentemente un ser humano) y se modificadas genéticamente (es decir, se transducen o transfectan *in vitro*) con un vector que expresa un CAR desvelado en el presente documento. La célula modificada con CAR se puede administrar a un receptor mamífero para ofrecer un beneficio terapéutico. El receptor mamífero puede ser un humano y la célula modificada con CAR puede ser autóloga con respecto al receptor. Como alternativa, las células pueden ser alogénicas, singénicas o xenogénicas con respecto al receptor.

- 50 El procedimiento para la expansión *ex vivo* de células madre y progenitoras hematopoyéticas se describe en la Patente EE.UU. n.º 5.199.942 y puede aplicarse a las células de la presente divulgación. Se conocen otros métodos adecuados en la técnica, por lo que la presente divulgación no se limita a ningún método en particular de expansión *ex vivo* de las células. En resumen, el cultivo *ex vivo* y la expansión de linfocitos T comprende: (1) recoger células madre o progenitoras hematopoyéticas CD34+ de mamífero de sangre periférica extraída o explantes de médula ósea; y (2) expandir tales células *ex vivo*. Además de los factores de crecimiento celulares descritos en la Patente de EE.UU. n.º 5.199.942, otros factores tales como flt3-L, IL-1, IL-3 y ligando c-kit, se pueden utilizar para el cultivo y expansión de las células.

- 60 Además de utilizar una vacuna basada en células en término de inmunización *ex vivo*, la presente divulgación también proporciona composiciones y métodos para inmunización *in vivo* para potenciar una respuesta inmunitaria dirigida contra un antígeno en un paciente.

- 65 Normalmente, las células activadas y expandidas según lo descrito en el presente documento pueden utilizarse en el tratamiento y prevención de enfermedades que aparecen en individuos que se encuentran inmunocomprometidos. En particular, los linfocitos T modificados con CAR de la divulgación se usan en el tratamiento de CCL. En ciertos casos,

las células de la divulgación se utilizan en el tratamiento de pacientes en riesgo de desarrollar CCL. Por tanto, la presente divulgación proporciona métodos para el tratamiento o prevención de CCL que comprende administración a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de linfocitos T modificados con CAR de la divulgación.

Los linfocitos T modificados con CAR de la presente divulgación se pueden administrarse solos o como una composición farmacéutica junto con diluyentes y/o con otros componentes tales como IL-2 u otras poblaciones de citocinas o células. En resumen, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden comprender una población de células diana según lo descrito en el presente documento, junto con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Tales composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada de fosfato y similares; carbohidratos tal como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente divulgación se formulan preferentemente para administración intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden administrar de una forma adecuada a la enfermedad a tratar (o a prevenir). La cantidad y frecuencia de administración se determinará mediante factores tales como la afección del paciente y el tipo y severidad de la enfermedad del paciente, aunque las dosis adecuadas se pueden determinar mediante ensayos clínicos.

Cuando se indica "una cantidad eficaz inmunológicamente", "una cantidad eficaz antitumoral", "una cantidad eficaz inhibidora de tumor" o "cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones de la presente divulgación a administrarse se puede determinar por un médico, considerando las diferencias individuales en edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis y afección del paciente (sujeto). Normalmente se puede afirmar que una composición farmacéutica que comprende los linfocitos T descritos en el presente documento se puede administrar en una dosis de 10^4 a 10^9 células/kg de masa corporal, preferentemente 10^5 a 10^6 células/kg de masa corporal, incluyendo todos los valores enteros dentro de esos intervalos. Las composiciones de linfocitos T pueden administrarse múltiples veces en estas dosis. Las células se pueden administrar utilizando técnicas de infusión que se conocen bien en inmunoterapia (véase, por ejemplo, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988). La posología óptima y el régimen de tratamiento para un paciente particular puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica de la medicina mediante la monitorización del paciente en cuanto a signos de enfermedad y ajuste del tratamiento en consecuencia.

En ciertos casos, puede ser deseable administrar linfocitos T activados a un sujeto y a continuación reextraer sangre (o tener una aféresis realizada), activar los linfocitos T de la misma según la presente divulgación y reinfundir al paciente con estos linfocitos T activados y expandidos. Este proceso se puede llevar a cabo múltiples veces cada pocas semanas. En ciertos casos, los linfocitos T se pueden activar de extracciones de sangre desde 10cc a 400cc. En ciertos casos, los linfocitos T se activan de extracciones de sangre de 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc o 100cc. Sin constreñirse a ninguna teoría, la utilización de este protocolo de extracción de sangre múltiple/reinfusión múltiple puede servir para seleccionar ciertas poblaciones de linfocitos T.

La administración de las composiciones objeto se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente, incluyendo la inhalación de aerosoles, inyección, ingestión, transfusión, implante o trasplante. Las composiciones descritas en el presente documento se pueden administrar a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, intraganglionar, intramedular, intramuscular, mediante inyección intravenosa (i.v.) o por vía intraperitoneal. En un caso, Las composiciones de la presente divulgación se administran a un paciente por vía intradérmica o inyección subcutánea. En otro caso, las composiciones de la presente divulgación se administran preferentemente mediante inyección i.v. Las composiciones de linfocitos T se pueden inyectar directamente en un tumor, nódulo linfático o lugar de infección.

En ciertos casos de la presente divulgación, se administran a pacientes células activadas y expandidas utilizando los métodos descritos en el presente documento u otros métodos conocidos en la técnica en los que se expanden linfocitos T a niveles terapéuticos, junto a (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) muchas modalidades de tratamiento relevantes, incluyendo, pero sin limitarse al tratamiento con agentes tales como terapia antiviral, cidofovir e interleucina-2, Cytarabina (también conocida como ARA-C) o tratamiento con natalizumab para pacientes de EM o tratamiento con efalizumab para pacientes con psoriasis u otros tratamientos para pacientes con LMP. En casos adicionales, los linfocitos T de la divulgación se pueden utilizar en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes immunoablativos tales como CAM PATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias con anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiación. Estos fármacos inhiben la calcineurina fosfatasa dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la p70S6 quinasa que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina) (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). En un caso adicional, se administran las composiciones celulares de la presente divulgación a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) trasplante de médula ósea, terapia ablativa de linfocitos T utilizando agentes quimioterapéuticos tales como, fludarabina, radioterapia de haz externo (RHE), ciclofosfamida o anticuerpos tales

como OKT3 o CAMPATH. En otro caso, se administran las composiciones celulares de la presente divulgación siguiendo la terapia ablativa de linfocitos T, tales como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, en un caso, los sujetos pueden someterse a tratamiento estándar con quimioterapia de dosis alta seguida de trasplante de células madre de sangre periférica. En ciertos casos, tras al trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunitarias expandidas de la presente divulgación. En un caso adicional, se administran células expandidas antes o después de la cirugía.

La posología de los tratamientos anteriores a administrar a un paciente variará según la naturaleza precisa de la afección a tratar y el receptor del tratamiento. El escalado de la posología para administración humana se puede realizar según las prácticas aceptadas en la técnica. La dosis para CAMPATH, por ejemplo, normalmente estará en el intervalo de 1 a aproximadamente 100 mg para un paciente adulto, habitualmente administrado diariamente durante un periodo de entre 1 y 30 días. La dosis diaria preferida es de 1 a 10 mg por día, aunque en algunos casos se pueden emplear dosis mayores de hasta 40 mg por día (descritas en la Patente de EE.UU. N.º 6.120.766).

15 Tratamiento del síndrome de liberación de citocinas (SLC)

La invención se basa parcialmente en el descubrimiento de que la proliferación *in vivo* de células CART19 y la actividad antitumoral potente asociada con la misma, también se asocia con el SLC, que conduce a la linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH; del inglés, Hemophagocytic Lymphohistiocytosis), también llamada síndrome de activación de macrófagos (MAS; del inglés, Macrophage Activation Syndrome). Sin intención de adherirse a ninguna teoría en particular, se cree que el MAS/HLH es un biomarcador único que se asocia con actividad antitumoral potente de CART19 y que puede ser necesario para la misma.

Por consiguiente, la divulgación proporciona una primera línea de terapia que comprende la administración de CAR de la divulgación al paciente y una segunda línea de terapia que comprende la administración de un tipo de terapia para gestionar los niveles elevados de ciertos factores solubles que resultan de la primera línea de terapia del uso de linfocitos T de CAR.

En un caso, la segunda línea de terapia comprende composiciones y métodos para el tratamiento de SLC. Los síntomas de SLC incluyen fiebre elevada, náuseas, hipotensión transitoria, hipoxia y similares. La presente divulgación se basa en la observación de células CART19 de elevados niveles de factores solubles inducidos en el paciente que incluye pero no se limita a IFN- γ , TNF α , IL-2 y IL-6. Por tanto, la segunda línea de terapia comprende compuestos y métodos para neutralizar los efectos contra las citocinas elevadas que resultan de la administración de células CART19. En un caso, los agentes neutralizantes son capaces de contrarrestar el brote concertado de actividad/expresión de citocinas y por tanto, son útiles para la prevención, mejoría y tratamiento de SLC asociado con la terapia de CART19.

En un caso, el tratamiento de SLC se realiza sobre el día 10-12 tras la infusión de células CART19.

En un caso, la segunda línea de terapia comprende administrar un esteroide al paciente. En otro caso, la segunda línea de terapia comprende administrar un esteroide o más, un inhibidor de TNF α y un inhibidor de IL-6. Un ejemplo de un inhibidor de TNF α entanercept. Un ejemplo de un inhibidor de IL-6 es Tocilizumab (toc).

EJEMPLOS EXPERIMENTALES

La invención se describe en detalle adicionalmente en referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos únicamente y no se tiene la intención de que sean limitantes, a menos que se especifique de otro modo. Por tanto, la invención no debe interpretarse como limitada a los siguientes ejemplos, sino más bien, debe interpretarse como que abarca cualquiera y todas las variaciones que llegan a ser evidentes como resultado de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

Sin ninguna descripción adicional, se cree que un experto en la materia puede, utilizando la descripción precedente y siguiendo los ejemplos ilustrativos, hacer y utilizar los compuestos de la presente invención y practicar los métodos reivindicados. Por tanto, los siguientes ejemplos útiles, señalan específicamente los casos preferidos de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes en ningún caso del resto de la divulgación.

Ejemplo 1: Terapia de citocinas junto con infusión de linfocitos T de CAR

Los resultados presentados en el presente documento demuestran que los pacientes tras la infusión de linfocitos T de CAR muestran niveles de expresión diferenciados de diversas citocinas. En algunos casos, los niveles elevados de algunas citocinas resultan de la toxicidad de los linfocitos T infundidos (Figura 1). Se observó que el tocilizumab (anti-IL6) puede mitigar la toxicidad de los CAR y aparentemente conservan los efectos antitumorales en 2 de 2 pacientes (Figura 2). Sin intención de adherirse a ninguna teoría en particular, se cree que anakinra y otros reactivos que bloquean la IL-1 pueden ser útiles también en este sentido. Los datos presentados en el presente documento también demuestran que la IL-1 se eleva en los pacientes y que esto puede conducir al aumento posterior de IL-6. La anakinra es una proteína recombinante de IL-1Ra que se une a los receptores de IL1 y bloquea tanto la señalización de IL-1

alfa como de beta. La anakinra tiene una hemivida corta. Existe una ventaja en el uso de anakinra para empezar a tratar pacientes, dado que tanto IL-1 alfa como beta pueden bloquearse y también liberan la tormenta de citocinas y mantienen el efecto antitumoral.

- 5 Se observó también que las intervenciones de anticuerpos no impactaron la funcionalidad celular de CART19, medida mediante perforina e IFN- γ (Figura 3).

Ejemplo 2: Las células de receptor de antígeno quimérico T redirigido de CD19 (CART 19) inducen un síndrome de liberación de citocinas (SLC) e inducción del síndrome de activación de macrófagos (MAS) tratable que puede ser gestionado mediante el antagonista de IL-6 Tocilizumab (toc)

La infusión con células CART19 da como resultado la proliferación *in vivo* de 100 a 100,000x, síndrome de lisis tumoral seguido de actividad antitumoral duradera y persistencia prolongada en pacientes con tumores de linfocitos B. Los resultados presentados en el presente documento demuestran que la proliferación *in vivo* de células CART 19 y la actividad antitumoral potente se asocia con la misma se asocia con el SLC, que conduce a la linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH; del inglés, Hemophagocytic Lymphohistiocytosis), también denominada MAS. Sin intención de adherirse a ninguna teoría en particular, se cree que el MAS/HLH es un biomarcador único que se asocia con actividad antitumoral potente y que puede ser necesario para la misma.

Se transducieron linfocitos T autólogos lentiviralmente con un CAR compuesto de anti-CD19 scFv/4-1BB/CD3-zeta, activados/expandidos *ex vivo* con perlas de anti-CD3/anti-CD28 y a continuación se infundieron en pacientes de LLA o LLC con enfermedades persistentes después de 2-8 tratamientos anteriores. La actividad anti LLA de CART19 se modeló también en un modelo de xenoinjerto de ratón con nivel elevado de LLA humano/injerto de linfocitos T humanos y detección simultánea de los linfocitos T de CAR y LLA utilizando imágenes bioluminiscentes de 2 colores.

Los resultados presentados en el presente documento proporcionan resultados actualizados de 10 pacientes que recibieron células CART19, incluyendo 9 pacientes con LLC y 1 paciente pediátrico con LLA refractaria recidivante. 6/9 pacientes evaluables tuvieron una recuperación completa (RC) o una recuperación parcial (RP), incluyendo 4 CR sostenidos. Si bien no hubo toxicidad de infusión aguda, todos los pacientes que respondieron desarrollaron también SLC. Todos tuvieron fiebre alta, así como hipotensión/hipoxia de grado 3 o 4. El SLC precedió al pico de expresión de células CART19 en sangre y a continuación se incrementó en intensidad hasta el pico de células CART19 (D10-31 después de la infusión). El paciente de LLA experimentó la toxicidad más considerable, con hipotensión de grado 4 y fallo respiratorio. La terapia de esteroides el D6 no dio como resultado ninguna mejoría. En D9, al percibir niveles elevados de TNF α e IL-6 (incrementos pico sobre el nivel inicial: IFN γ a 6040x; IL-6 a 988x, IL-2R a 56x, IL-2 a 163x y TNF α a 17x), se administraron antagonista de TNF α e IL-6 (etanercept y toc). Esto dio como resultado la resolución de la fiebre y la hipotensión dentro de las 12 h y una desconexión rápida del ventilador al ambiente. Estas intervenciones no tuvieron impacto aparente sobre la expansión o eficacia de las células CART19: el pico de linfocitos T de CAR (2539 células CAR+/uL; 77 % de CD3 células por flujo) sucedió el D11 y la médula ósea de D23 mostró RC con enfermedad mínima residual (EMR) negativa, en comparación con su médula en estudio inicial que mostró un 65 % de blastos. Aunque ella no tenía historial de LLA de SNC, el fluido espinal mostró células de CART19 detectables (21 linfocitos/mcL; 78 % CAR+). 4 meses tras la infusión, este paciente permaneció RC, con 17 células CART19/uL en la sangre y células CD3 CAR+ 31 % en la médula.

La evaluación clínica de los pacientes que respondieron posteriores muestra que en todos hubo evidencia de MAS/HLH que incluye elevaciones dramáticas de ferritina y evidencia histológica de HLH. Los niveles del pico de ferritina estuvieron en el intervalo de 44.000 a 605.000, precediendo y continuando con proliferación de pico de linfocitos T. Otros hallazgos coherentes incluyen una rápida presentación de hepatosplenomegalia no relacionada con la enfermedad y un CID moderado.

Posteriormente, 3 pacientes de LLC también se han tratado con toc, también con prompt y con resolución llamativa de fiebre elevada, hipotensión e hipoxia. Un paciente recibió toc el D10 y alcanzó una RC acompañada de expansión de CART19. Otro paciente tuvo una rápida resolución de SLC después de la administración de toc el día 9 y el seguimiento para respuesta es demasiado corto. Un tercer paciente de LLC recibió toc el D3 para fiebre temprana y no tuvo proliferación de CART-19 ni respuesta.

Para modelizar la temporización del bloqueo de citocina, se establecieron xenoinjertos utilizando LLA pediátricos primarios bioluminiscentes y a continuación se trataron con células extra de fabricación clínica. Las células CART19 proliferaron y resultaron tener supervivencia prolongada. El bloqueo de citocina anterior a la infusión de linfocitos T con toc y/o etanercept revocó el control de enfermedad con menos proliferación *in vivo* de células CART19 infundidas, confirmando el resultado observado en el paciente al que se le proporcionó toc tempranamente (D3).

Los linfocitos T CART19 pueden producir expansión *in vivo* masiva, persistencia a largo plazo y eficacia antitumoral, pero también pueden inducir un SLC considerable con características indicadoras de MAS/HLH, que responde rápidamente al bloqueo de citocinas. Producido antes de la iniciación de la proliferación considerable de CART19, el bloqueo de TNF α y/o IL-6 puede interferir en la proliferación y la función efectora, pero si se produce en un punto en el que la proliferación celular está en curso, el toc puede mitigar los síntomas que se han observado que se

correlacionan con respuestas clínicas robustas.

Ejemplo 3 Remisión de LLA mediante linfocitos T que expresan Receptores antigénicos quiméricos:

5 Los resultados presentados en el presente documento demuestran que los linfocitos T de CAR tienen actividad clínica en leucemia linfocítica aguda (LLA). En resumen, dos pacientes pediátricas con LLA de pre-B se trataron con 10^6 to 10^7 /kg de linfocitos T transducidos con anticuerpo anti-CD 19 y una molécula de señalización de linfocitos T (linfocitos T de CAR CTL019; también conocidas como CART19). Los linfocitos T CTL019 se expandieron más de 1000 veces en ambas pacientes y hubo tráfico a la médula ósea. Además, los linfocitos T de CAR fueron capaces de cruzar la
10 barrera hematoencefálica y persistieron en niveles elevados durante al menos 6 meses, como se midió en el fluido espinal cerebral. Se observaron ocho eventos adversos severos. Ambas pacientes desarrollaron un síndrome de liberación de citocinas (SLC) y aplasia de linfocitos B. En una niña, el SLC fue severo y el bloqueo de citocinas con etanercept y tocilizumab resultó efectivo para revertir el síndrome y sin embargo no evitó la expansión de linfocitos T de CAR y la eficacia antileucémica. Se observó la remisión completa en ambas pacientes y se mantiene en un paciente
15 a los 9 meses después del tratamiento. El otro paciente recayó con células blásticas que no expresaron más CD19 aproximadamente 2 meses después del tratamiento.

Los resultados presentados en el presente documento demuestran que los linfocitos T de CAR modificados son capaces de matar incluso células de leucemia aguda resistentes a tratamientos agresivos *in vivo*. La emergencia de
20 células tumorales que no expresan más la diana indica una necesidad de dirigirse a otras moléculas además de CD19 en algunos pacientes con LLA.

Se ha informado de la expansión *in vivo* y los efectos antileucémicos robustos de las células CTL019 (CART 19) en 3 pacientes con LLC (Porter et al., 2011, N Engl J Med 365:725-33; Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73). CTL019 es un CAR que incluye un dominio de señalización CD137 (4-1BB) y se expresa utilizando
25 tecnología de vector lentiviral (Milone et al., 2009, Mol Ther 17:1453-64). Los resultados presentados en el presente documento muestran el uso de CTL019 en 2 pacientes pediátricas con LLA refractario y recidivante. En ambas pacientes hubo remisión de leucemia, acompañada de expansión robusta de CTL019 *in vivo* con tráfico a médula y al SNC. Los efectos antileucémicos resultaron potentes dado que un paciente tuvo enfermedad resistente a quimioterapia
30 excluyente de trasplante de células madre de donante alogénico y el otro paciente recayó después de trasplante de sangre de cordón umbilical alogénica y fue resistente a terapia con blinatumomab (anti-CD3 y anti-CD 19 quiméricos biespecíficos).

Los materiales y métodos empleados en estos experimentos se describen a continuación.

35 Materiales y métodos

CART 19

40 La producción de CTL019 (CART 19) se ha informado anteriormente (Porter et al., 2011, N Engl J Med 365:725-33; Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73). CTL019 se detectó y cuantificó en especímenes de pacientes como se informó anteriormente (Porter et al., 2011, N Engl J Med 365:725-33; Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73).

45 Extracción de muestras y procesamiento

Las muestras (sangre periférica, médula ósea) se recogieron en tubos vacutainer de parte superior lavanda (K2EDTA) o parte superior roja (sin aditivos) (Becton Dickinson). Los tubos de parte superior lavanda se entregaron al laboratorio dentro de las 2 horas de extracción o se transportaron durante la noche a temperatura ambiente en contenedores
50 aislados esencialmente según lo descrito (Olson et al., 2011, J Transl Med 9:26) antes del procesamiento. Las muestras se procesaron dentro de los 30 minutos desde la recepción según las POS de laboratorio establecidas. La sangre periférica y las células mononucleares de médula se purificaron, procesaron y almacenaron en nitrógeno líquido según lo descrito (Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73). Los tubos de parte superior roja se procesaron dentro de las 2 horas de la extracción incluyendo el tiempo de coagulación; se aisló el suero mediante
55 centrifugación, se hicieron alícuotas en alícuotas de un solo uso de 100 μ l y se almacenaron a -80 °C. El LCR se entregó al laboratorio dentro de los 30 minutos desde la aspiración y se recogieron las células del LCR mediante centrifugación del fluido de LCR y se procesaron para ADN y citometría de flujo.

Análisis de Q-PCR

60 Se recogieron muestras de sangre completa o de médula en tubos vacutainer BD (K2EDTA) de parte superior lavanda (Becton Dickinson). El ADN genómico se aisló directamente de sangre completa y se realizaron análisis de Q-PCR en masa utilizando tecnología Taqman de ABI y un ensayo validado para detectar la secuencia de transgén de CAR de CD19 según lo descrito (Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73), utilizando 200 ng de ADN
65 genómico por punto de tiempo para las muestras de sangre periférica y de médula y 18-21,7 ng de ADN genómico por punto de tiempo para muestras de LCR. Para determinar el número de copias por unidad de ADN, se generó una

curva patrón de 8 puntos que consiste en 5 to 10^6 copias de plásmido CTL019 de lentivirus añadidos en 100 ng de ADN genómico no transducido de ADN genómico de control. Cada punto de datos (muestra, curva patrón) se evaluó por triplicado con un valor Ct positivo en réplicas 3/3 con un % de CV menor del 0,95 % para todos los valores cuantificables. Se llevó a cabo una reacción de amplificación en paralelo para controlar la calidad de ADN a examinar utilizando una entrada de 20 ng de ADN genómico de sangre periférica y médula (2-4,3 ng para muestras de LCR) y una combinación de cebador/sonda específica para secuencia genómica no transcrita en dirección 5' del gen CDKN1A según se ha descrito (Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73). Estas reacciones de amplificación generaron un factor de corrección (FC) para corregir por calculado frente a entrada de ADN real. Se calcularon las copias de transgén por microgramo de ADN según la fórmula: copias calculadas de la curva patrón de CTL019 por entrada de ADN x FC x 1000 ng. La exactitud de este ensayo se determinó mediante la capacidad para cuantificar el marcaje del producto celular infundido mediante Q-PCR. Estas determinaciones ciegas generaron valores de Q-PCR y de marcaje de flujo de 11,1 % y 11,6 %, respectivamente, para el CHOP-100 y 20,0 % y 14,4 %, respectivamente, marcando los productos de infusión de CHOP-101.

Análisis de factores solubles

Se recogió sangre completa en tubos vacutainer BD de parte superior roja (sin aditivos) (Becton Dickinson), se procesó para obtener suero utilizando las POS de laboratorio establecidas, se hicieron alícuotas para uso individual y se almacenaron a -80 °C. La cuantificación de factores solubles de citocina se llevó a cabo utilizando tecnología Luminex bead array y los kits adquiridos a través de Life Technologies (Invitrogen). Los ensayos se realizaron siguiendo el protocolo del fabricante con una curva patrón de 9 puntos generada utilizando series de dilución de 3 veces. Los 2 puntos externos estándar se evaluaron por duplicado y los 5 patrones internos sin repetición; todas las muestras se evaluaron por duplicado en dilución 1:2; el % de CV para las medidas duplicadas fue menor del 15 %. Los datos se adquirieron con un FlexMAP-3D mediante porcentaje y se analizaron utilizando el software Xponent 4.0 y un análisis de regresión logística de 5 parámetros. Los intervalos de cuantificación de la curva patrón se determinaron mediante el intervalo 80-120 % (valor observado/esperado). Los valores informados incluyeron aquellos dentro del intervalo de la curva patrón y aquellos calculados mediante el análisis de regresión logística.

Reactivos de anticuerpos

Se usaron los siguientes anticuerpos para estos estudios: MDA-CAR (Jena and Cooper, 2013, L. Anti-idiotypic antibody for CD19. PlosONE 2013; en prensa), un anticuerpo murino para CD19 CAR conjugado to Alexa647. Anticuerpos para inmunofenotipado multiparamétrico: paneles de detección de linfocitos T: anti-CD3-FITC, anti-CD8-PE, anti-CD14-PE-Cy7, anti-CD16-PE-Cy7, anti-CD19-PE-Cy7 anti-CD16-PE-Cy7. Paneles de detección de linfocitos B: anti-CD20-FITC, anti-CD45-PE, anti-CD45-APC, anti-CD19-PE-Cy7, anti-CD 19-PE, anti-CD34-PCP-e710 y anti CD34-APC se consiguieron de e-Biosciences.

Citometría de flujo multiparámetro

Se evaluaron células mediante citometría de flujo directamente después del procesamiento de Ficoll-Paque, con la excepción de la muestra inicial de CHOP-101 la cual fue evaluada inmediatamente después de descongelar una muestra crioconservada. El inmunofenotipado multiparamétrico para muestras de sangre periférica y médula se realizó utilizando aproximadamente $0.2-0.5 \times 10^6$ células totales por afección (dependiendo de la producción de células en las muestras) y para muestras de LCR utilizando cantidades traza de células recogidas después de la centrifugación del fluido de LCR y utilizando tinciones de fluorescencia menos uno (FMO) como se describió en el texto. Las células se tiñeron en 100 µl de PBS durante 30 minutos en hielo utilizando concentraciones de anticuerpos y reactivos recomendadas por el fabricante, se lavaron y se resuspendieron en paraformaldehído 0,5 % y se adquirieron utilizando un citómetro Accuri C6 equipado con un láser Azul (488) y Rojo (633 nm). Los archivos de Accuri se exportaron en formato FCS y se analizaron usando el software FlowJo (Versión 9.5.3, Treestar). Los valores de compensación se establecieron utilizando tinciones de anticuerpos y perlas de compensación BD (Becton Dickinson) y se calcularon mediante el software. La estrategia de regionalización (gating) para linfocitos T fue como sigue: Células vivas (FSC/SSC) > canal de descarte (CD14+CD16+CD19-PECy7) frente a CD3+ > CD3+. La estrategia de regionalización (gating) para linfocitos B fue como sigue: Células vivas (FSC/SSC) > SSC eventos bajos > CD19+. En las Figuras individuales se describen más detalles de la regionalización (gating) para las muestras de CHOP-100 y CHOP-101.

Análisis molecular de EMR

El análisis molecular de EMR se realizó por Adaptive Biotechnologies (Seattle, Washington) y la secuenciación de última generación de alto rendimiento de la región BCR IGH CDR3 utilizando el ensayo immunoSEQ basado en la plataforma HiSeq/MiSeq de Illumina (Larimore et al., 2012, J Immunol 189:3221-30). Para estos análisis, 701-6.000 ng (aproximadamente 111.000-950.000 equivalentes genómicos) de ADN aislado de muestras de sangre completa o médula obtenidas de pacientes se sometieron a PCR multiplexada combinada y secuenciación seguida de análisis algorítmico para cuantificar secuencias IGH CDR3 en las muestras. Se realizaron amplificaciones paralelas y secuenciación de la región TCRB CDR3 (Robins et al., 2009, Blood 114:4099-107) en cada muestra para evaluar la clasificación de muestras de ADN. Para cada paciente, las secuencias de nucleótidos IGH CDR3 analizadas de muestras de diferentes puntos temporales se alinearon utilizando la herramienta de alineamiento de secuencias

múltiples EMBL-EBI (Goujon et al., 2010, Nucleic Acids Res 38:W695-9; Sievers et al., 2011, Mol Syst Biol 7:539). El clon dominante de la muestra del punto temporal más temprano se rastreó bioinformáticamente a través de las secuencias IGH CDR3 analizadas en las siguientes muestras de puntos temporales para identificar la presencia de secuencias con identidad de secuencia por pares del 95 % o mayor. Se informó, para cada punto temporal, el total de lecturas de secuenciación para aquellas secuencias similares al clon dominante.

Se describen, a continuación, los resultados de los experimentos.

Informes de casos

CHOP-100 fue una niña de 7 años de edad en su segunda recaída de LLA. Fue diagnosticada 2 años antes y alcanzó la remisión de una enfermedad mínima residual (EMR) negativa, recayendo 17 meses después del diagnóstico. Entró de nuevo en remisión después de la reinducción de quimioterapia, pero recayó 4 meses después, después de lo cual no respondió a clotaribina/etopósido/ciclofosfamida. Su cariotipo inicial fue 48,XX,del(9)(p21.3),+11,del(14)(q2?q24), + 16/46,XX[4]. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se recogieron por aféresis antes de la quimioterapia intensiva, anticipándose a que podría haber insuficientes linfocitos T en circulación para la fabricación de células después de tal tratamiento intensivo. Se infundieron células CTL019 a este paciente que se habían expandido con anti-CD3/CD28 y transducido lentiviralmente para expresar el CAR de anti-CD 19 en una dosis total de $3,8 \times 10^8$ células/kg ($1,2 \times 10^7$ CTL019 células/kg) proporcionada durante 3 días consecutivos según lo descrito anteriormente (Porter et al., 2011, N Engl J Med 365:725-33; Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73). No recibió quimioterapia de depleción linfocítica antes de sus infusiones de CTL019, con la terapia citotóxica más reciente dada 6 semanas antes de la infusión de CTL019. No se observaron toxicidades inmediatas de la infusión, pero se le hospitalizó debido a fiebre de bajo grado que progresó a fiebre elevada el día 4 y el día 5 la paciente se transfirió a la UCI pediátrica (CHOP-100, Figura 4A). A esto le siguió una progresión rápida hacia un compromiso respiratorio y cardiovascular importante que requirió ventilación mecánica y apoyo de presión sanguínea.

La segunda paciente fue una niña de 10 años (CHOP-101) que había experimentado su segunda recaída después de 4/6 trasplantes de cordón umbilical coincidentes no relacionados 28 meses después del diagnóstico y 10 meses antes de la infusión de CTL019. Experimentó enfermedad de injerto contra hospedador (EICH) después de su trasplante, que se resolvió con tratamiento; se encontraba fuera de inmunosupresión en el momento de su recaída. Posteriormente no volvió a entrar en remisión a pesar de múltiples terapias citotóxicas y biológicas. Su cariotipo inicial fue 46 XX, del(1)(p13), t(2;9)(q21;q21), t(3;17)(p24;q23), del(6)(q16q21), del(9)(q13q22), der(16)t(1;?;16)(p13;?p13.3)[9],//46, Xy[1]. Antes de la recogida de PBMC, se le trató con dos ciclos de blinatumomab (Bargou et al., 2008, Science 321:974-7), sin respuesta. Sus células sanguíneas periféricas fueron de origen donante un 68 % en el momento de la recogida de PBMC. Los linfocitos T CTL019 se fabricaron y se infundieron como una dosis total de 10^7 células/kg ($1,4 \times 10^6$ células CTL019/kg) en una dosis única, después de quimioterapia con etopósido/ciclofosfamida proporcionada para la depleción linfocítica una semana antes. Su médula ósea el día anterior a la infusión de CTL019 se reemplazó por una población de células de LLA CD19+/CD34+, con expresión variable de CD19 mediante citometría de flujo clínica estándar (Figura 7). No tuvo toxicidades de inmediatas de la infusión, pero desarrolló una fiebre el D+6 y se le ingresó en el hospital. No experimentó toxicidades pulmonares y no recibió glucocorticoides o terapia anticitocinas. CHOP-101 experimentó fiebre de origen desconocido, sospechosa de deberse a la liberación de citocinas (Figura 4B), mialgias y dos días de confusión (grado 3), que se resolvieron espontáneamente. No tuvo evidencia de EICH tras la infusión de las células CTL019. Aunque estas células se habían recogido de la paciente, eran de origen donante (cordón umbilical) en gran medida.

Inducción de remisión en ambos sujetos

Ambos sujetos tuvieron un incremento de linfocitos y neutrófilos en circulación en las 2 semanas siguientes a la infusión de CTL019, como se muestra en los gráficos de WBC totales, RAL y ANC referidos a la temporización de la infusión de CTL019 (Figura 4C). La mayoría de los linfocitos se compusieron de linfocitos T que expresaron el receptor de antígeno quimérico (Figura 8), mostrado en más detalle en la Figura 5. En ambos sujetos, se documentaron fiebres no infecciosas de alto grado, seguidas de elevaciones de la LDH (Figura 4A). Las elevaciones de LDH y la fiebre de alto grado fueron similares a las descritas previamente en pacientes de LLC después de la infusión de CTL019 (Porter et al., 2011, N Engl J Med 365:725-33; Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73). Aproximadamente un mes después de la infusión, se alcanzó la remisión morfológica negativa de EMR (<0,01 %) de la leucemia en ambos sujetos (Tabla 1).

La remisión clínica en CHOP-100 se asoció con una remisión molecular profunda que ha persistido durante al menos 9 meses hasta enero de 2013 (Tabla 1). La secuenciación del ADN de alto rendimiento del locus IGH reveló un descenso pronunciado en el total de lecturas de IGH el D+23 en sangre y médula de CHOP-100. El clon maligno no se detectó en la sangre o médula en más de 1 millón de equivalentes celulares secuenciados el D+180. Por contra, Las secuencias de receptor de linfocitos T se detectaron fácilmente en sangre y médula, indicando la integridad del ADN probado en todos los puntos temporales.

Tabla 1.: Inducción de remisión molecular en sangre y médula ósea de CHOP-100 y 101

Paciente	Tejido	Punto temporal (día)	Número de genomas de entrada (equivalentes celulares)	Total de lecturas de TCRβ	Total de lecturas de IGH	Total de lecturas únicas de IGH	Lecturas del clon dominante	Frecuencia del clon tumoral [%]
CHP959-100	Sangre	-1	111.340	525.717	189	6	185	97,88
		23	218.210	1.651.129	0	0	0	0,00
		87	288.152	1.416.378	0	0	0	0,00
	Médula	180	420.571	1.276.098	6	2	0	0,00
		-1	317.460	348.687	59.791	318	59.774	99,97
		23	362.819	1.712.507	37	2	33	89,19
CHP959-101	Sangre	87	645.333	425.128	10	1	10	100,00
		180	952.381	800.670	45	7	0	0,00
		-1	152.584	1.873.116	38.170	52	30.425	79,71
	Médula	23	417.371	1.462.911	92	5	18	19,60
		-1	158.730	2.417.992	68.368	65	50.887	74,43
		23	305.067	1.978.600	1.414	11	946	66,90
		60	916.571	N/D	530.833	206	363.736	68,90

El análisis molecular de enfermedad mínima residual se realizó sobre ADN aislado de sangre completa o médula

Toxicidad de CTL019

- 5 Los eventos adversos de grado 3 y 4 se resumen en la Tabla 2. Se observó toxicidad aguda en ambas pacientes, que consistió en fiebre y síndrome de liberación de citocinas (SLC) que evolucionó al síndrome de activación de macrófagos (MAS). Ambas pacientes se monitorizaron y se les proporcionó profilaxis para el síndrome de lisis tumoral. Ambas experimentaron elevaciones sustanciales de LDH, cuyas causas fueron probablemente multifactoriales, pero pudieron haber incluido el síndrome de lisis tumoral. Cada valor de ácido úrico en CHOP-100 estuvo por debajo de lo
- 10 normal o dentro del intervalo normal y recibió alopurinol solo los días 5-6. CHOP-101 recibió alopurinol profiláctico los días 0-14 y tuvo valores de ácido úrico anormales de 4,8-5,7 los días 8-10, coherentes con el síndrome de lisis tumoral leve.

Tabla 2: Eventos adversos (grado 3 y 4) en CHOP-100 y CHOP-101

CHP959-100				
Categoría de EA	Toxicidad de EA	Grado de EA	Descripción de EA	Duración
INFECCIÓN	Neutropenia febril	3	Neutropenia febril. Temperatura: Pico de temperatura 40,7 °C. Resuelta día 7 después de administrar tocilizumab.	7 días
GENERAL CARDIACO	Hipotensión	4	Shock que necesita de soporte vasopresor. Fuera de todo soporte vasopresor el día 7 excepto quitar dobutamina	4 días en grado 4, fuera de todos los vasopresores el día 12
VASCULAR	Síndrome de fuga vascular agudo	4	Potencialmente mortal: indicado soporte vasopresor o soporte ventilatorio	véase lo anterior
PULMONAR/VÍAS RESPIRATORIAS ALTAS	Síndrome de dificultad respiratoria en el adulto (SDRA)	4	Presente, indicado intubación. Rayos X de pecho despejado el día S.	12 días
CHP959-101				
Categoría de EA	Toxicidad de EA	Grado de EA	Descripción de EA	Duración
INFECCIÓN	Neutropenia febril	3	Neutropenia febril. Pico temperatura 40,3 °C. Resuelto el día 6	6 días
NEUROLOGÍA	Encefalopatía	3	Los padres informaron de confusión. IRM fue normal.	3 días
METABOLISMO/LABORATORIO	AST elevada	4	Valor del pico de AST: 1060 (Grado 4)	1 día en grado 4
METABOLISMO/LABORATORIO	ALT elevada	4	Valor del pico de ALT: 748 (Grado 4)	1 día en grado 4

- 15 Los eventos adversos se clasificaron según los criterios de terminología comunes para eventos adversos versión 3.0 (Common Terminology Criteria for Adverse Events 3.0)

- 20 En CHOP-100, se administraron glucocorticoides el D+5 con una breve respuesta en la curva de fiebre pero sin remisión de la hipotensión. Se proporcionó un solo tratamiento de terapia de anticitocinas que consiste en etanercept y tocilizumab el D+8 y le siguieron efectos clínicos rápidos: en horas le bajó la fiebre, se le desconectó de medicaciones vasoactivas y soporte ventilatorio según se resolvía el SDRA. No tuvo evidencia de laboratorio de un síndrome de lisis tumoral; sin embargo, se observó evidencia bioquímica de MAS con elevación de ferritina a 45.529ng/dl el D+11, coagulopatía con dímero D e hipofibrinogenemia elevada, hepatoesplenomegalia, elevación de transaminasas, LDH
- 25 elevada (Figura 4C) y triglicéridos elevados, así como un perfil de citocinas coherente con MAS. Su ferritina descendió a 2.368 el D+26 y las anomalías citoesqueléticas clínicas y de laboratorio de MAS se resolvieron.

- 30 En CHOP-101, aunque no hubo evidencia directa de un síndrome de lisis tumoral, a parte de fiebre y cambios en la LDH (Figura 4C), también desarrolló características de MAS con elevaciones en la ferritina hasta 33.360 el D+7, alcanzado el pico de 74.899 el día 11, transaminasas que alcanzaron el grado 4 durante 1 día y un dímero D elevado en suero. Estos cambios bioquímicos resultaron reversibles, dado que las transaminasas mejoraron a grado 1 y la ferritina descendió a 3.894 el D+21. Fue dada de alta del hospital el D+16.

Ambos sujetos desarrollaron elevaciones destacadas en un número de citocinas y de receptores de citocinas en el suero (Figura 1B). En ambas pacientes, fueron más destacadas las elevaciones en interferón- γ y IL-6. Estas observaciones son similares al patrón observado previamente en pacientes con LLC que también experimentaron remisión de leucemia después de infusión con CTL019 (Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73). Las elevaciones pico de citocinas se correlacionaron temporalmente con inflamación sistémica a juzgar por los cambios en la temperatura corporal interna (Figura 4C).

Expansión de CTL019 *in vivo* en pacientes con LLA

La fracción de linfocitos T CTL019 en circulación se incrementó progresivamente *in vivo* hasta el 72 % (CHOP-100) y el 34 % (CHOP-101) de linfocitos T (Figura 5A). La eficacia de transducción fue del 11,6 % y del 14,4 % en los linfocitos T infundidos en CHOP-100 y -101, respectivamente. Dado que el RAL se incrementó sustancialmente en ambas pacientes (Figura 4C) y que la frecuencia de células CTL019 se incrementó progresivamente *in vivo* desde la frecuencia inicial (Figura 8), hubo una expansión robusta y selectiva de células CTL019 en ambas pacientes. El incremento selectivo de linfocitos T que expresan CTL019 en ambas pacientes es coherente con un mecanismo antileucémico que implica expansión dirigida por CD19 y la eliminación posterior de células que expresan CD19 en ambas pacientes (Figura 6 y Figura 9).

El análisis de secuencia profundo molecular de TCR en las muestras de sangre periférica y de médula en CHOP-100 se obtuvo el D+23, cuando >65 % de células CD3+ en sangre periférica y médula se mostraron como CTL019+ mediante citometría de flujo, reveló la ausencia de un clonotipo de TCR de linfocitos T dominantes en ningún compartimento, con los 10 linfocitos T más abundantes presentes en frecuencias entre 0,18 - 0,7 % en médula ósea y 0,19 a 0,8 % en sangre periférica. Seis de los 10 clones dominantes fueron compartidos entre los dos compartimentos. Además, estuvieron presentes linfocitos T de CAR tanto CD4 como CD8. Por tanto, los linfocitos T parece que proliferan después de expansión la estimulada con CD19 y no mediante señales de TCR o eventos específicos de clones tales como activación por integración del lentivirus.

Tráfico y morfología de linfocitos T de CAR CTL019 en médula y SNC

Las células CTL019 se expandieron más de 1000 veces en la sangre periférica y la médula ósea (Figura 5). La frecuencia de células CTL019 aumentó a más del 10 % de los linfocitos T en circulación el D+20 en ambos sujetos (Figura 8), con la magnitud absoluta de expansión de CTL019 similar a la observada en pacientes con LLC (Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73). Inesperadamente, las células en el LCR mostraron un alto grado de marcaje del gen de CTL019 y persistieron a alta frecuencia hasta 6 meses (Figura 5B). El tráfico de células CTL019 al LCR se dio sorprendentemente, que ninguno de las pacientes tubo leucemia del SNC detectable por citospina en el momento de la infusión o en la evaluación 1 mes después del tratamiento. Adicionalmente, en informes anteriores de terapia con CAR para tumores malignos de linfocitos B, no se observó circulación de linfocitos T de CAR al SNC (Till et al., 2008, Blood 112:2261-71; Brentjens et al., 2011, Blood 118:4817-28; Savoldo et al., 2011, J Clin Invest 121:1822-5; Jensen et al., 2010, Biol Blood Marrow Transplant 16:1245-56; Till et al., 2012, Blood 119:3940-50; Kochenderfer et al., 2012, Blood 119:2709-20). La morfología de los linfocitos en sangre y LCF se muestra para CHOP-100 y 101 en la Figura 5D. Dado que >70 % de los linfocitos en circulación el D+10 fueron células CTL019 (Figuras 5A y 5B), la mayoría de los linfocitos granulares de grandes dimensiones mostrados en el panel izquierdo de la Figura 5D probablemente son células CTL019. Asimismo, dado que muchos linfocitos en el LCR se obtuvieron de CHOP-101 el D+23 fueron células CTL019 (Figuras 5B y 5C), la citospina de linfocitos de LCR en la Figura 5D muy probablemente representa la morfología de células CTL019 *in vivo* que han circulado al SNC.

Inducción de aplasia de linfocitos B

Ambos sujetos tuvieron una eliminación de células positivas CD19 en médula ósea y sangre en el plazo de 1 mes tras la infusión de CTL019 (Figura 6 y Figura 9). En CHOP-100, una gran proporción de células que permanecen en la médula el D+6 tras la infusión fueron células blásticas leucémicas CD19+CD20+. Esta población de células no fue detectable el D+23, un efecto que se mantiene más allá de los 9 meses en esta paciente (Figura 9A). Dado que el CHOP-100 no tuvo quimioterapia en las 6 semanas precedentes a la infusión de CTL019, esto indica que las células CTL019 fueron suficientes para extirpar linfocitos B normales y leucémicos en este caso.

Aparición de una variante de escape de CD19 en CHOP-101

El CHOP-101 experimentó una recaída clínica apreciable en la sangre periférica a los 2 meses después de la infusión de CTL019, como se evidenció por la reaparición de células blásticas en la circulación. Estas células fueron Cd45débil positivas, CD34 positivo y no expresaron CD19 (Figura 6). La ausencia de las células dominantes originales CD34débil+ CD34+CD19débil+ es coherente con una presión selectiva potente antileucémica de los linfocitos T de CAR CTL019 dirigidos a CD19 (Figura 9B). La secuenciación profunda de IGH reveló la presencia del clon maligno en sangre periférica y en médula ya el D+23 (Tabla 1), a pesar de una evaluación clínica de la negatividad de EMR mediante citometría de flujo en este punto del tiempo (Figura 7). Además, la secuenciación profunda del material obtenido en la recaída clínica reveló que las células CD45débilCD34+CD19- se relacionan clonalmente con las células

dominantes iniciales CD45dim+CD34+CD19dim+, dado que comparten la misma secuencia IGH.

Remisión de LLA mediante linfocitos T que expresan receptores de antígenos quiméricos

- 5 Los resultados presentados en el presente documento demuestran la inducción de remisión de leucemia recidivante y refractaria en las dos primeros pacientes tratadas en este protocolo. La remisión se ha sostenido en un sujeto y en el otro sujeto estuvo acompañada de recaída debido a la emergencia de blastos CD19 negativos. Las células CTL019 genéticamente modificadas circularon al SNC en niveles elevados en ambas pacientes. Se observaron elevaciones de citocinas que estuvieron sobre el objetivo, reversibles y temporalmente acompañadas de eliminación de células
- 10 blásticas que expresaron CD19 en ambos sujetos. La inducción de remisión completa en LLA de CD19 positiva después de infusión de linfocitos T de CAR es alentadora, particularmente dada la baja frecuencia de remisiones después de la infusión de infusiones de linfocitos de donantes alogénicos que no expresan CAR (Kolb et al., 1995, Blood 86:2041-50; Collins et al., 1997, J Clin Oncol 15:433-44; Collins et al., 2000, Bone Marrow Transplant 26(5):511-6). La tecnología de secuenciación profunda indica que la infusión de CAR CTL019 estuvo asociada con una reducción
- 15 5-log sostenida en la frecuencia de linfocitos B malignos en CHOP-100, indicando adicionalmente efectos antitumorales potentes en la leucemia refractaria a quimioterapia.

La desafortunada aparición de células blásticas CD19 negativas en un sujeto es coherente con los informes anteriores que documentan la existencia de células precursoras negativas CD19 en algunos casos de LLA (Hotfilder et al., 2005, Cancer Research 65:1442-9; le Viseur et al., 2008, Cancer Cell 14:47-58). Es posible que la coinfusión de linfocitos T de CAR redirigidos a nuevas especificidades junto con CD19 pueda disminuir la probabilidad de este evento. Hasta ahora, no se había observado la recaída con células de escape CD19 negativas en adultos con LLC después del

20 tratamiento con células CTL019 (Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73), lo que sugiere que este tema puede ser específico de un subconjunto de leucemias agudas. La inducción de remisión en CHOP-100 no requirió quimioterapia concomitante y es coherente con un informe previo que muestra que las remisiones en LLC pueden retardarse varias semanas después de quimioterapia (Porter et al., 2011, N Engl J Med 365:725-33). Por tanto, la administración concomitante de quimioterapia citotóxica puede no ser necesaria para efectos antitumorales mediados por CAR.

30 Ambas pacientes pediátricas de LLA experimentaron toxicidad sustancial después de la infusión de CTL019. Se observó inducción de aplasia de linfocitos B e indica que los linfocitos T de CAR pueden funcionar en el establecimiento de leucemia aguda recidivante. Ambas pacientes han desarrollado también evidencia clínica y de laboratorio del síndrome de liberación de citocinas y del síndrome de activación de macrófagos en el plazo de una semana desde la infusión. El perfil de citocinas observado en estas pacientes es similar a informes anteriores de patrones de citocinas en niños con hemofagocitosis y síndrome de activación de macrófagos o linfohistiocitosis hemofagocítica (Tang et al., 2008, Br J Haematol 143:84-91; Behrens et al., 2011, J Clin Invest 121(6):2264-77). El síndrome de activación de macrófagos se caracteriza por la hiperinflamación con fiebre prolongada, hepatoesplenomegalia y citopenias. Los hallazgos de laboratorio característicos de este síndrome son elevadas ferritina, triglicéridos, transaminasas, bilirrubina (principalmente conjugada) y cadena α del receptor soluble de interleucina-2 y fibrinógeno disminuido (Janka et al., 2012, Annu Rev Med 63:233-46). Los estudios recientes indican que el tocilizumab (anti-IL6) es prometedor para la EICH resistente a glucocorticoides (Drobyski et al., 2011, Biol Blood Marrow Transplant 17(12):1862-8; Le Huu et al., 2012, J Invest Dermatol 132(12):2752-61; Tawara et al., 2011, Clinical Cancer Research 17:77-88) y los resultados

40 presentados en el presente documento son coherentes con estos datos.

45 La expansión vigorosa *in vivo* de CTL019, la aplasia de linfocitos B persistente y la actividad prominente antileucémica implican funciones efectoras sustanciales y sostenidas de las células CTL019 en pacientes pediátricos con LLA avanzada. La eficacia elevada del tráfico de linfocitos T de CAR al SNC es alentadora como mecanismo para la vigilancia para prevenir la recaída en un lugar santuario como el SNC (Pullen et al., 1993, J Clin Oncol 11(5):839-49) y sostiene las pruebas de las terapias dirigidas por linfocitos T de CAR para linfomas de SNC y tumores malignos primarios del SNC. Con la excepción de la aplasia de linfocitos B, la duración de la cual está actualmente sin definir, se cree que el uso de terapias basadas en inmunidad tales como CTL019 pueden tener un perfil favorable de efectos adversos a largo plazo en comparación con las dosis elevadas de quimioterapia y radiación que se utilizan como el estándar actual de cuidados para la mayoría de casos de leucemia pediátrica (Garcia-Manero and Thomas, 2001, Hematol Oncol Clin North Am 15(1):163-205).

Inducción de remisiones completas de LLA mediante linfocitos T que expresan receptores de antígenos quiméricos

El tocilizumab (anti-IL6) es prometedor para EICH resistente a glucocorticoides y los resultados presentados en el presente documento son coherentes con estos datos. Adicionalmente, es interesante observar que en CHOP 100, el SLC que se manifiesta como fiebre elevada, hipotensión y fallo multiorgánico, resultó resistente a las dosis elevadas de glucocorticoides administrados durante los 2 días previos a la terapia dirigida de citocinas. Por último, en CHOP-100 los cambios bifásicos en IL-1 β , IL-1RA e IL-2 mostrados en la Figure 4B podrían haber estado relacionados con terapia dirigida por citocinas con etanercept y tocilizumab.

65 La inducción de remisión en un paciente refractario a terapia con blinatumomab adicionalmente destaca la potencia de células CTL019. La eficacia elevada del tráfico de linfocitos T de CAR al SNC es alentadora como mecanismo para

la vigilancia para prevenir la recaída en un lugar santuario como el SNC y sostiene las pruebas de las terapias dirigidas por linfocitos T de CAR para linfomas de SNC y tumores malignos primarios del SNC. Ninguna de las pacientes ha experimentado efectos cognitivos que puedan adscribirse al tráfico de linfocitos T al SNC.

5 Ejemplo 4: Información de resumen

- 10 Se midieron varios marcadores en pacientes que reciben linfocitos T de CAR. Como ejemplo no limitante, se midieron Ferritina, Mioglobina e inhibidor-1 del activador del plasminógeno (PAI-1); véanse las Figuras 10, 11 y 12, respectivamente. Los niveles elevados de estos marcadores se correlacionaron con el resultado. Pacientes designados como -01, -03, -09, -100 y -101 se clasificaron como respondedores completos. Pacientes designados como -02, -05, -10 (segunda infusión y respuesta alrededor de D70) y -12 se clasificaron como respondedores parciales. Los pacientes designados como -06, -07 y -14 se clasificaron como no respondedores.

REIVINDICACIONES

1. Linfocitos T transducidos para expresar un receptor de antígeno quimérico (linfocitos T de CAR) para utilizar en un método de tratamiento de cáncer en un paciente, en el que el método comprende la infusión de dichos linfocitos T de CAR al paciente y la administración de un inhibidor de citocinas para gestionar la toxicidad que resulta de la infusión de linfocitos T de CAR, en el que el inhibidor de citocinas es un inhibidor de IL-6.
2. Un inhibidor de citocinas para utilizar en un método de gestión de la toxicidad que resulta de la infusión de linfocitos T transducidos para expresar un receptor de antígeno quimérico (linfocitos T de CAR) a un paciente, en el que los linfocitos T de CAR se utilizan para tratar el cáncer en el paciente, en el que adicionalmente dicho inhibidor de citocinas es un inhibidor de IL-6.
3. Los linfocitos T de CAR para uso de la reivindicación 1 o el inhibidor de citocinas para uso de la reivindicación 2, en las que dicho inhibidor de IL-6 es un inhibidor de ácido nucleico tal como un ARN pequeño de interferencia (ARNip) o un ARN antisentido, un anticuerpo o una molécula química pequeña.
4. Los linfocitos T de CAR para uso de la reivindicación 1 o 3, o el inhibidor de citocinas para uso de la reivindicación 2 o 3, en las que dicho inhibidor de IL-6 es un anticuerpo anti-IL-6 que se une específicamente a IL-6 o en las que el inhibidor de IL-6 es tocilizumab.
5. Los linfocitos T de CAR para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, o el inhibidor de citocinas para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en las que el CAR comprende un dominio extracelular que tiene un dominio de reconocimiento de antígeno que se dirige a un antígeno tumoral, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico.
6. Los linfocitos T de CAR para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-5 o el inhibidor de citocinas para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en las que el CAR es un CAR de anti-CD19, opcionalmente en el que la fracción de unión al antígeno se fusiona con uno o más dominios intracelulares seleccionados de un dominio de señalización de CD137 (4-1BB), un dominio de señalización de CD28, un dominio de señal de Cd3zeta y cualquier combinación de los mismos.
7. Los linfocitos T de CAR o el inhibidor de citocinas para uso de la reivindicación 6, en la que dicha toxicidad es el síndrome de liberación de citocinas, que conduce a linfocitosis hemofagocítica / síndrome de activación de macrófagos.
8. Los linfocitos T de CAR o el inhibidor de citocinas para uso de la reivindicación 6 o 7, en las que dichos linfocitos T de CAR inducen niveles elevados de IFN- γ , TNF α e IL-2 en el paciente.
9. Los linfocitos T de CAR para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-7 o el inhibidor de citocinas para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en las que los niveles de cualquier citocina seleccionada de los factores IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-1Ra, IL-2R, IFN- α , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, TNF α , GM-CSF, G-CSF, CXCL9, CXCL 10, factores CXCR, VEGF, RANTES, EOTAXINA, EGF, HGF, FGF- β , CD40, CD40L y ferritina se incrementan o disminuyen como resultado de recibir dicha infusión de linfocitos T de CAR.
10. Los linfocitos T de CAR para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-9 o el inhibidor de citocinas para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en las que el cáncer es:
 - (i) un cáncer hematológico, por ejemplo, leucemia aguda (tal como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemia crónica (tal como leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (formas indolente y de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de la cadena pesada, síndrome mielodisplásico, leucemia de células pilosas y mielodisplasia; LLA de pre-B (indicación pediátrica), LLA de adultos, linfoma de células del manto o linfoma difuso de linfocitos B grandes, adicionalmente en las que el CAR es un CAR de anti-CD19;
 - (ii) un tumor sólido;
 - (iii) un cáncer primario o metastásico; y/o
 - (iv) resistente o refractario a la quimioterapia convencional.
11. Los linfocitos T de CAR para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-10 o el inhibidor de citocinas para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-10, en las que el CAR se diseña para dirigirse a CD19 y el cáncer se selecciona de pre-LLAB (indicación pediátrica), LLA de adultos, linfoma de células del manto y linfoma difuso de linfocitos B grandes.
12. Los linfocitos T de CAR para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-11 o el inhibidor de citocinas para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-11, en las que los linfocitos T de CAR son linfocitos T humanos transducidos

in vivo con un vector que expresa el CAR y los linfocitos T de CAR son autólogos para el paciente.

5 13. Los linfocitos T de CAR para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-12 o el inhibidor de citocinas para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-12, en las que los linfocitos T de CAR se administran como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/u otros componentes pero no con IL-2.

10 14. Los linfocitos T de CAR para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-13 o el inhibidor de citocinas para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-13, en las que el método adicionalmente comprende la administración de un esteroide y/o un inhibidor de TNF α , por ejemplo, etanercept, al paciente.

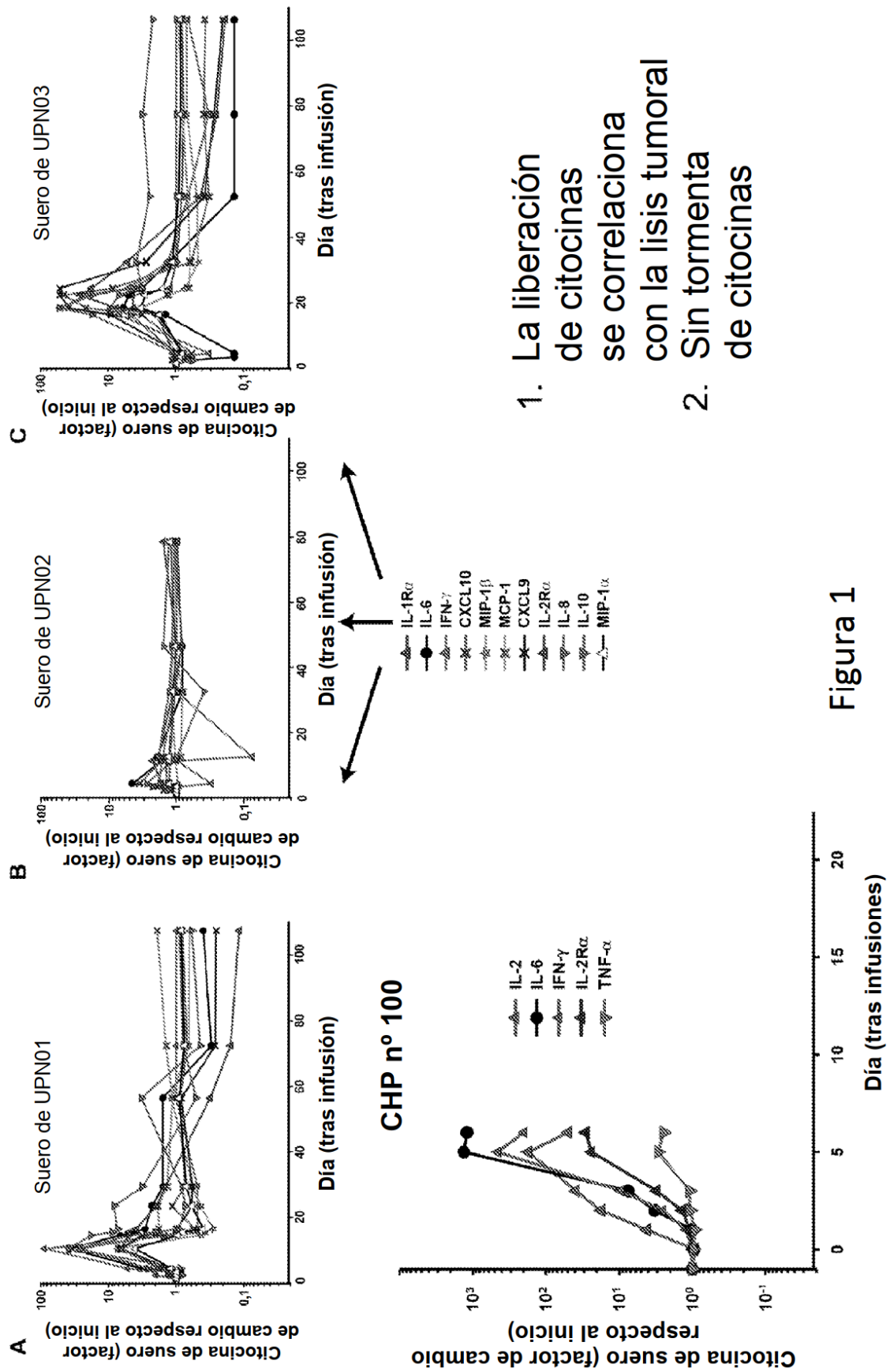


Figura 1

Síndrome de liberación de citocinas tardía sobre diana y síndrome de lisis tumoral en LLA r/r

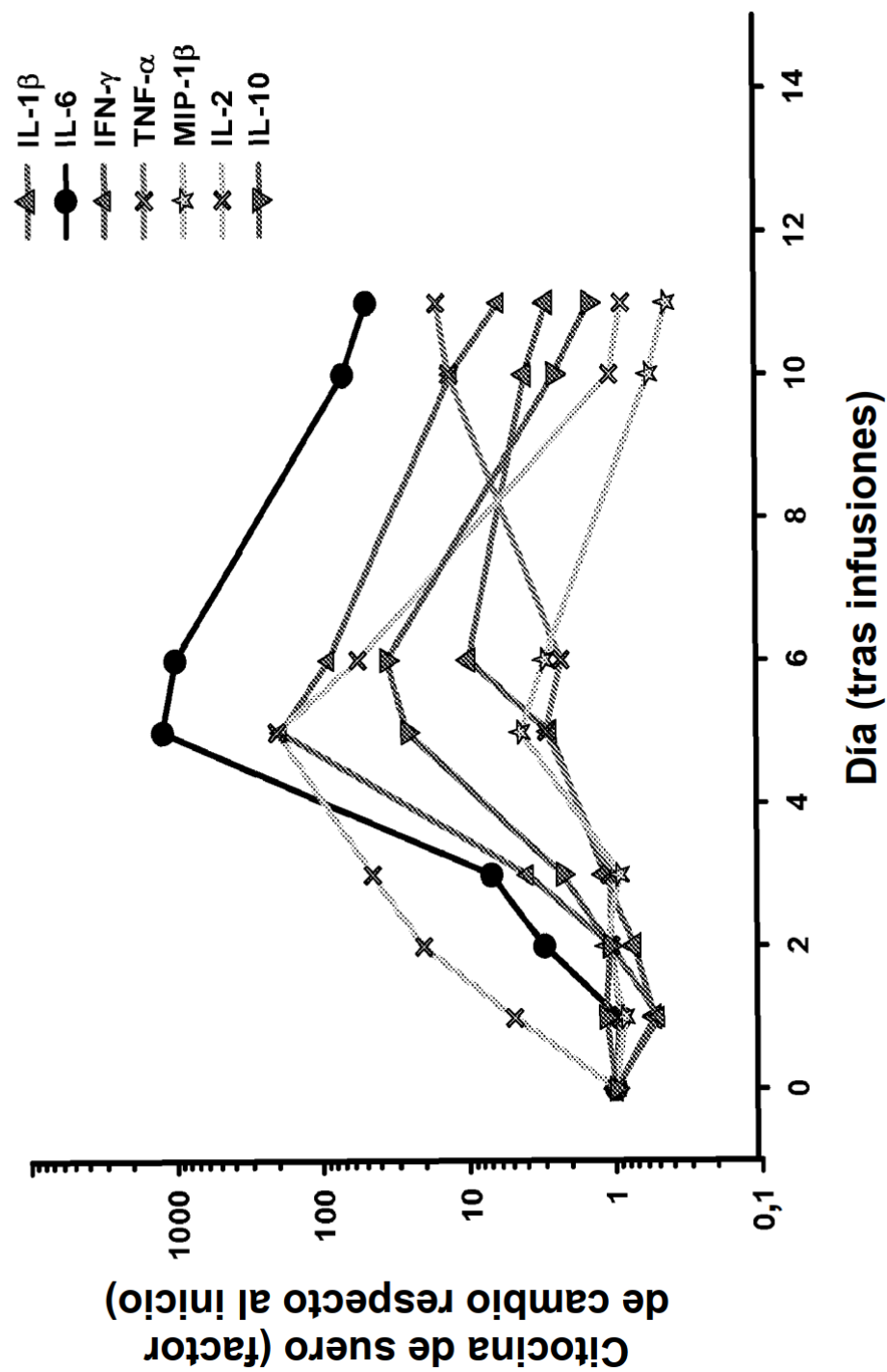


Figura 2

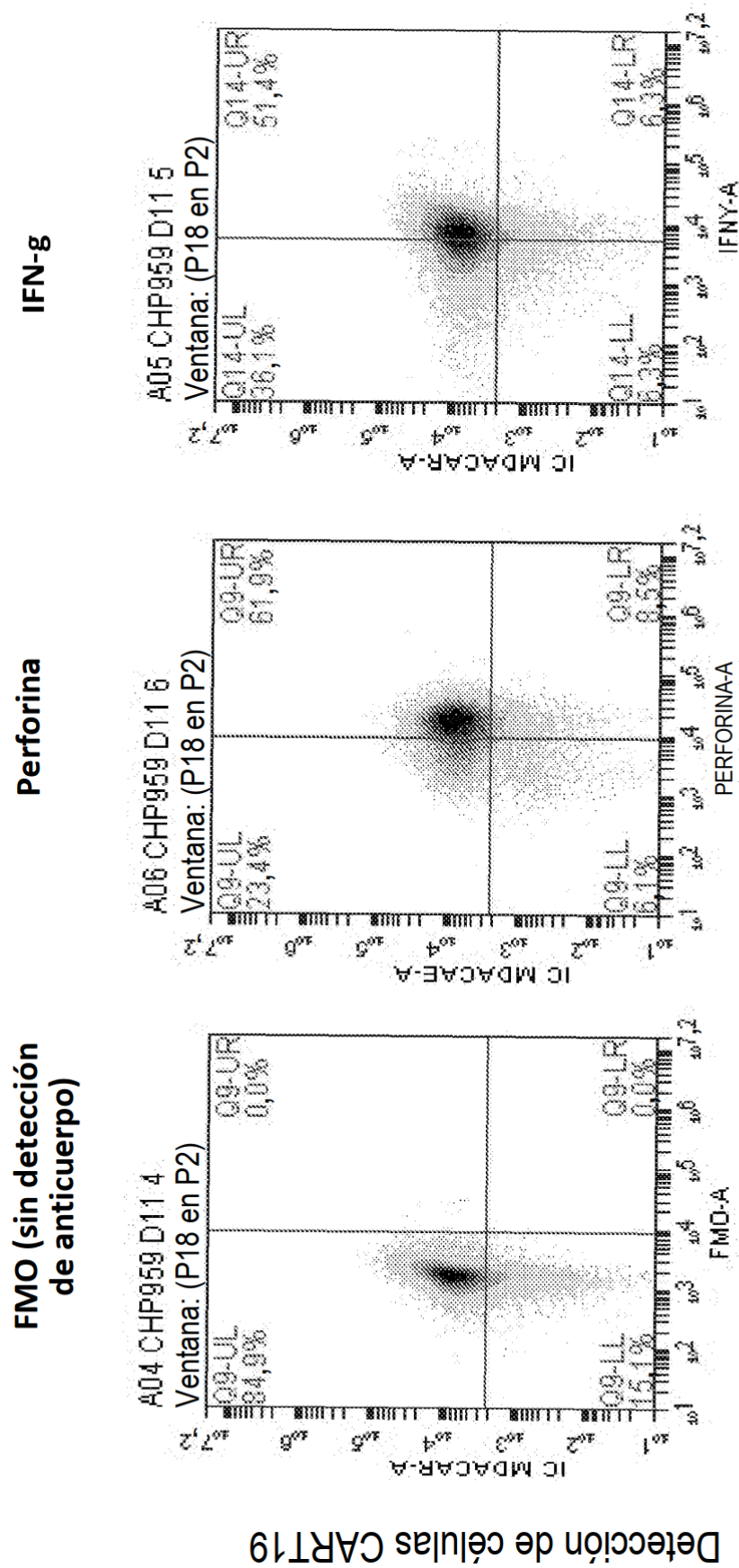


Figura 3

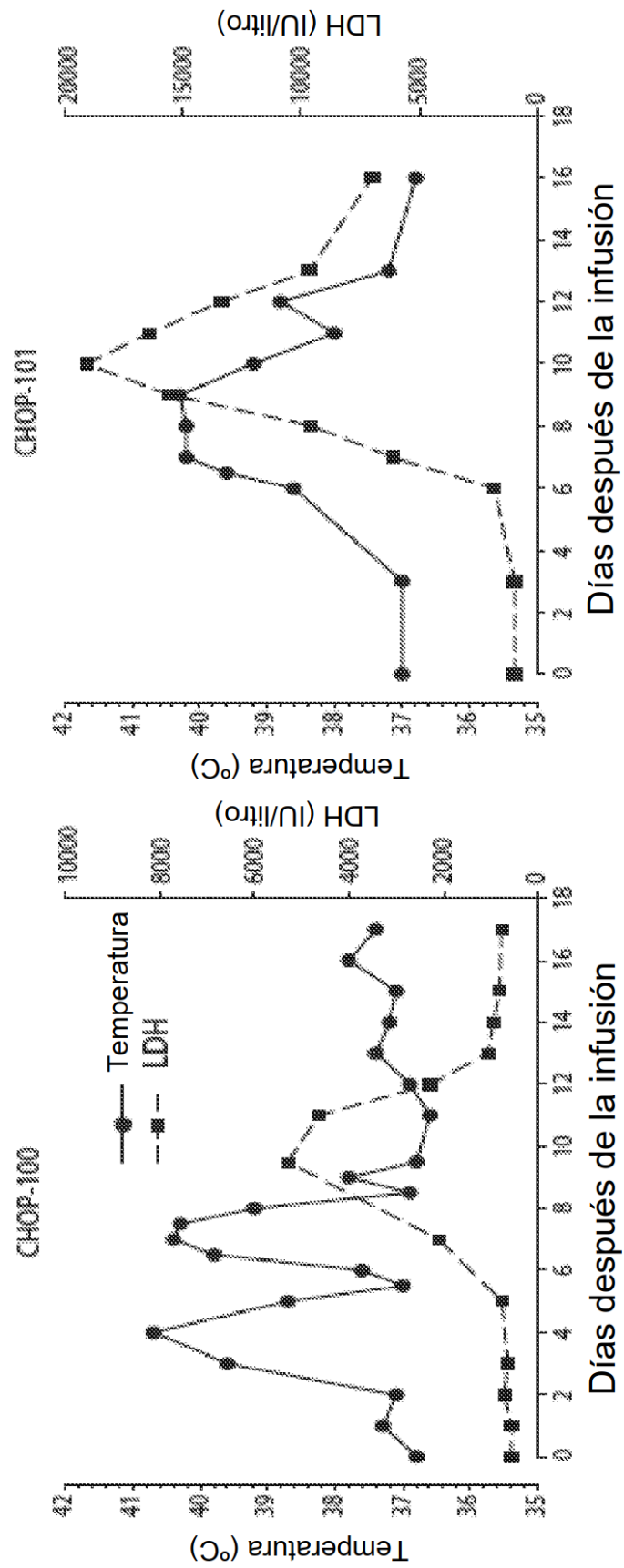


Figura 4A

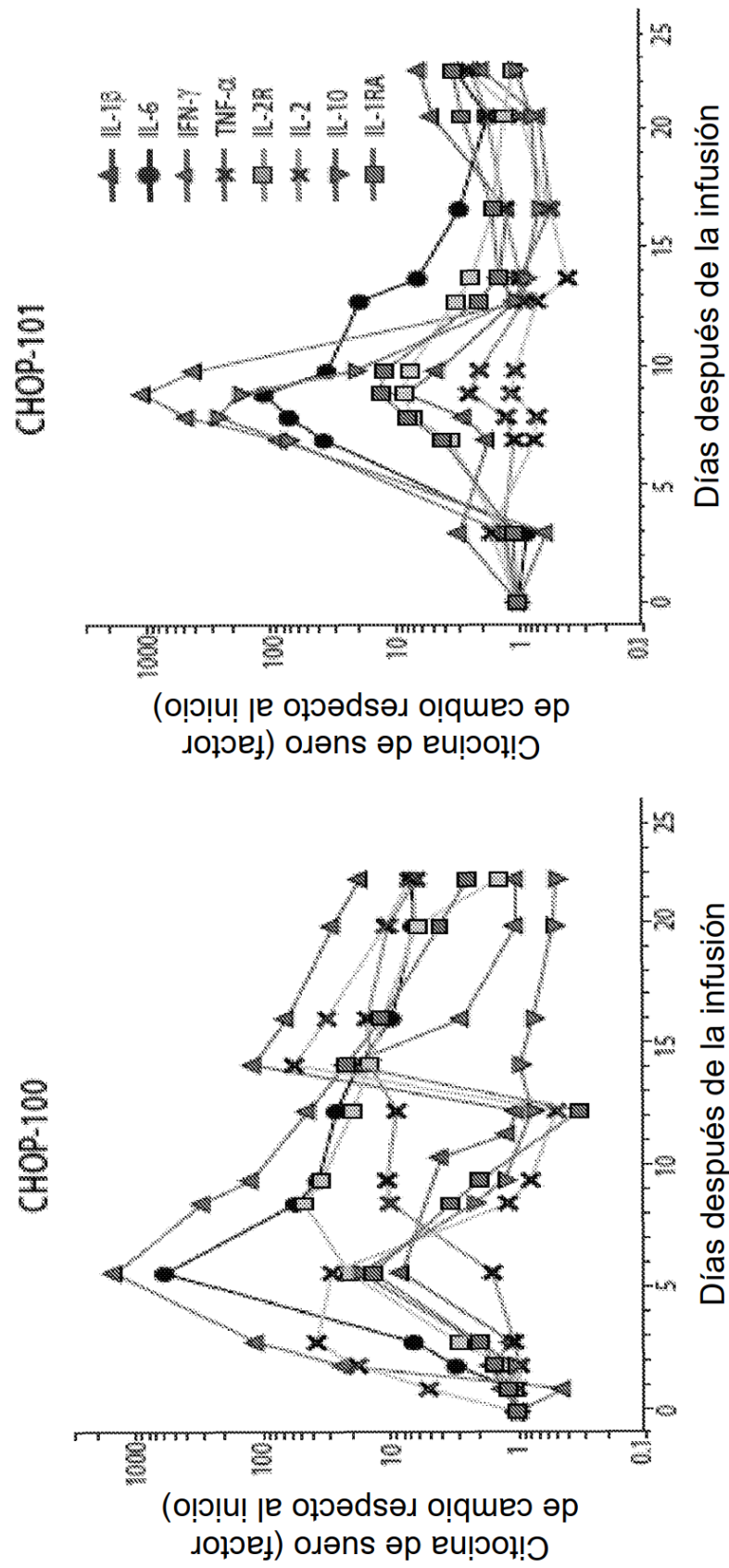


Figura 4B

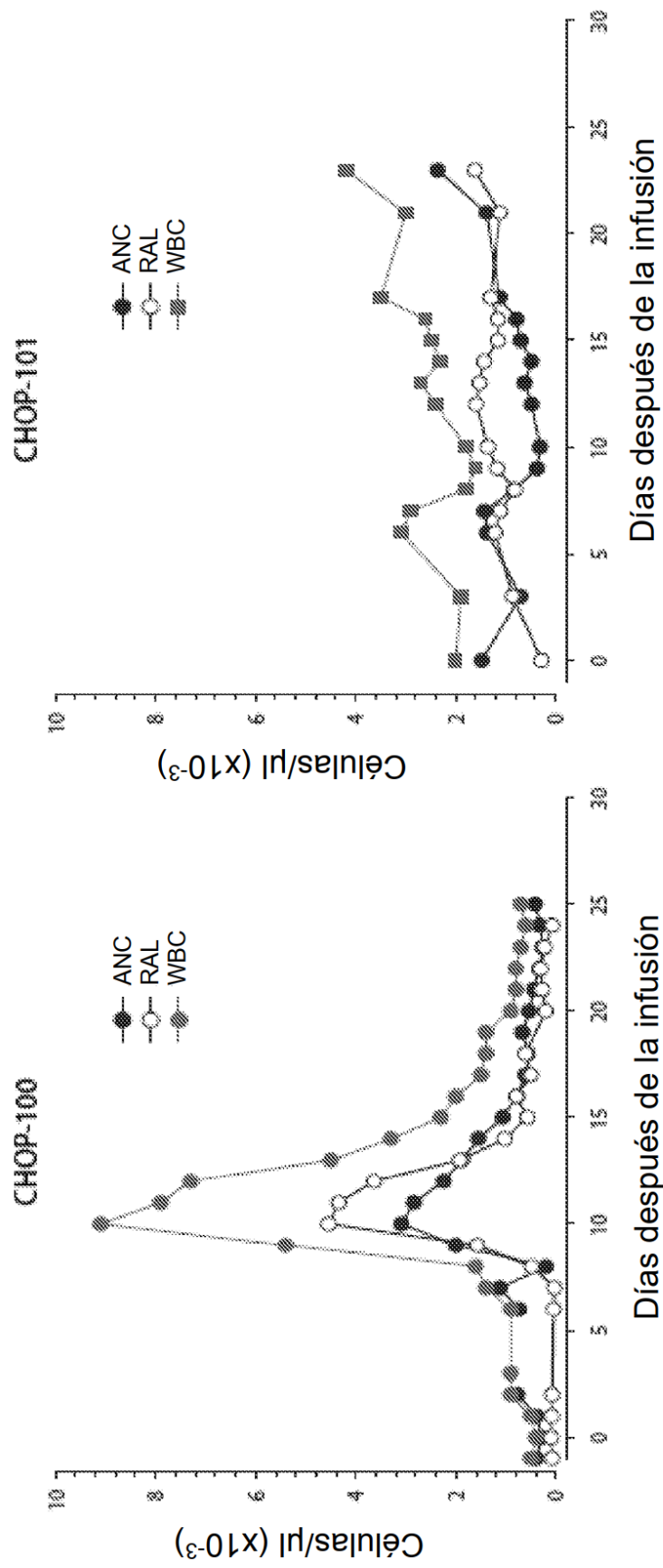


Figura 4C

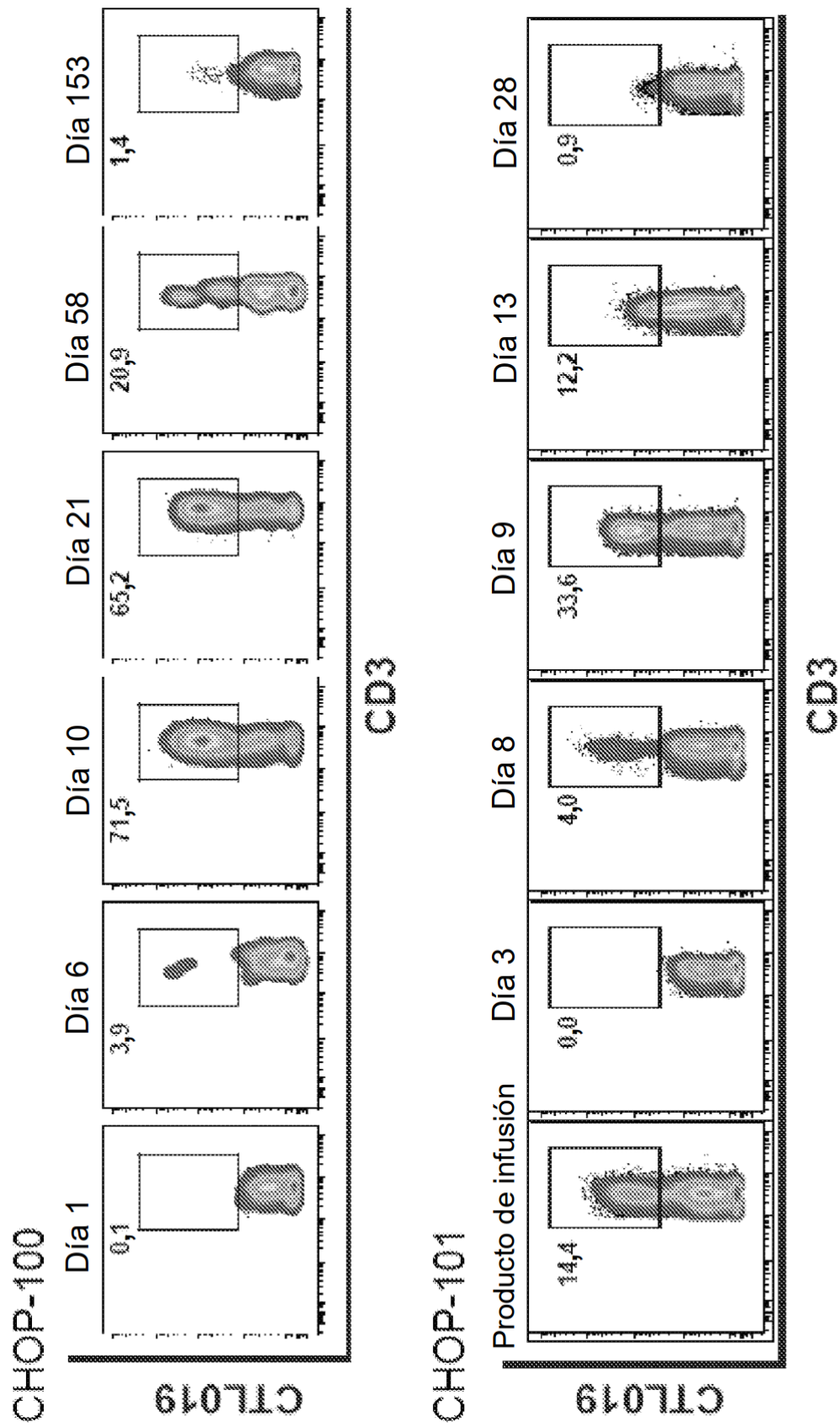


Figura 5A

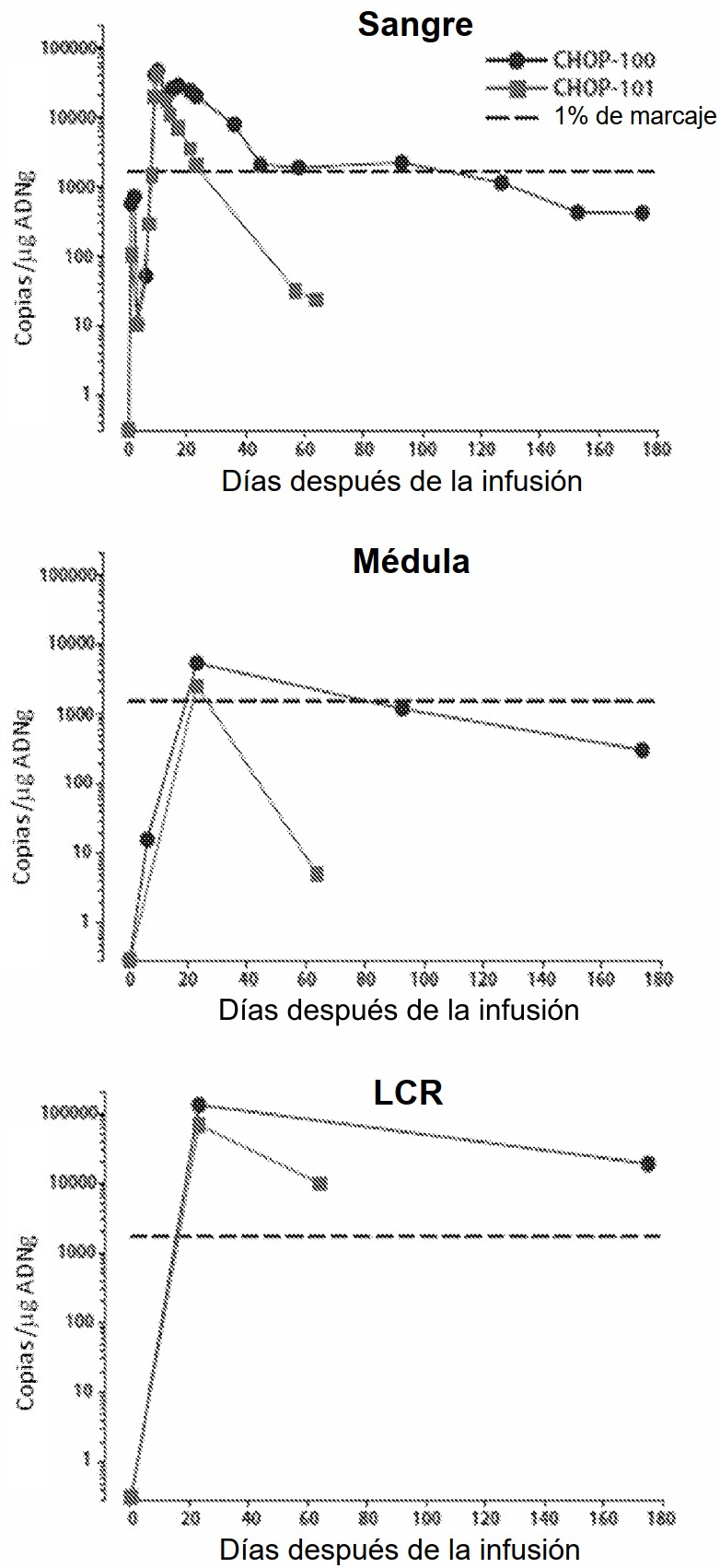


Figura 5B

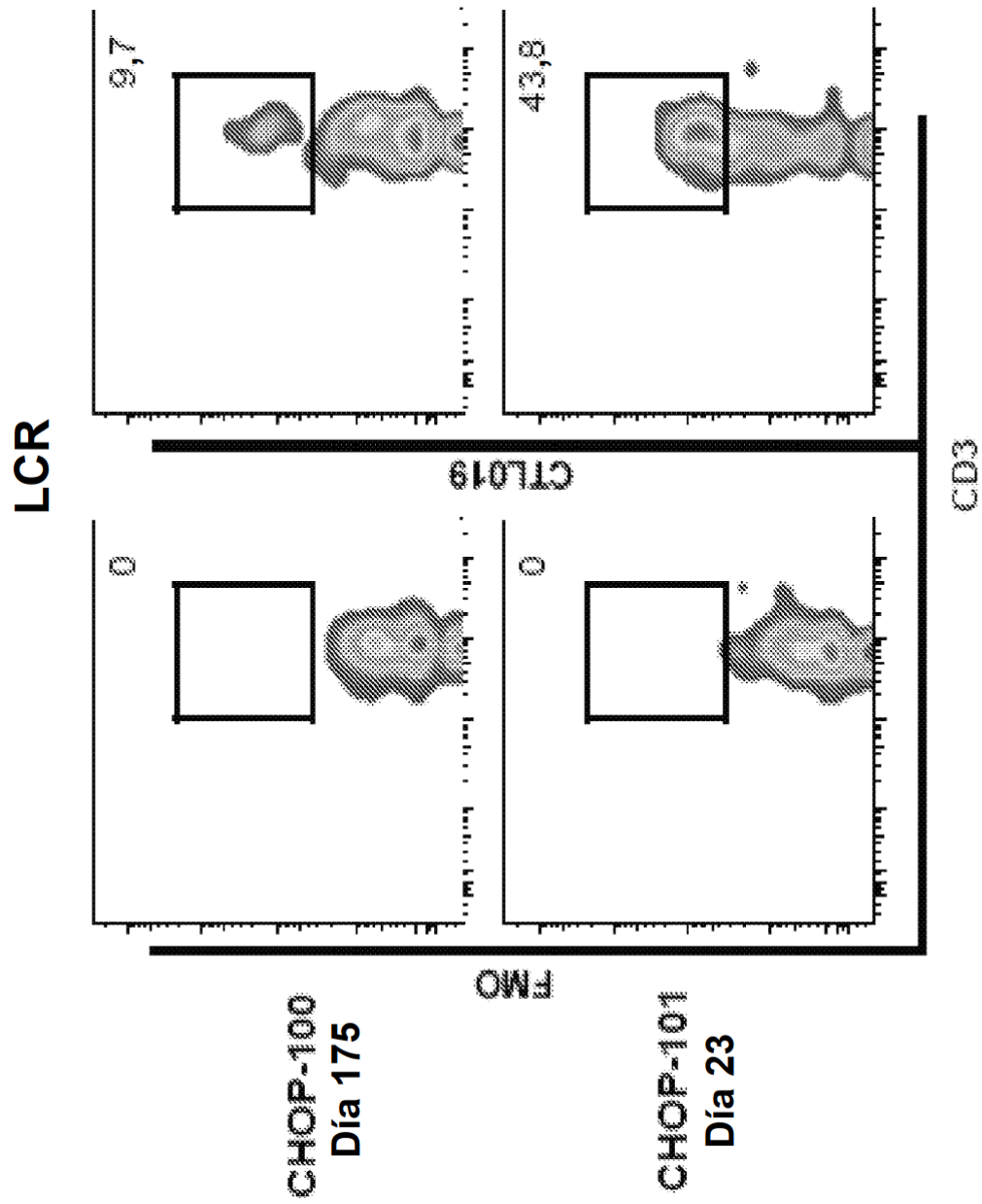
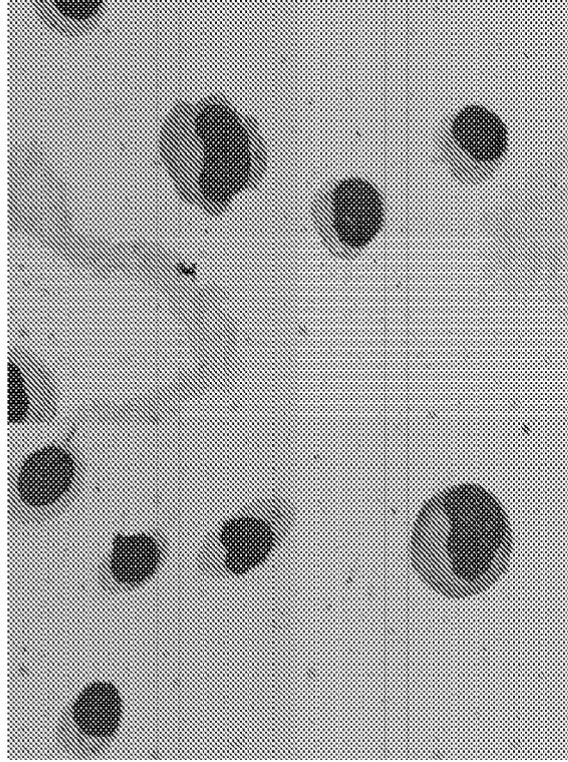


Figura 5C

LCR (Día 23)



Sangre (Día 10)

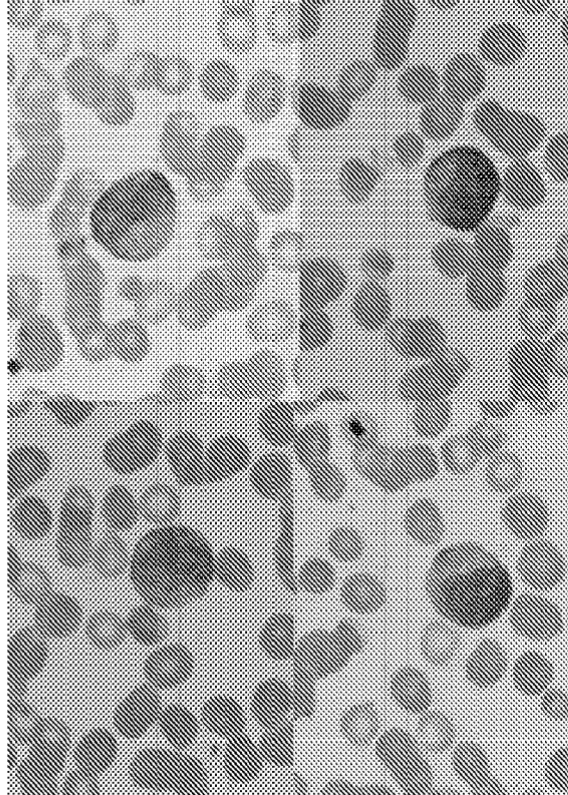
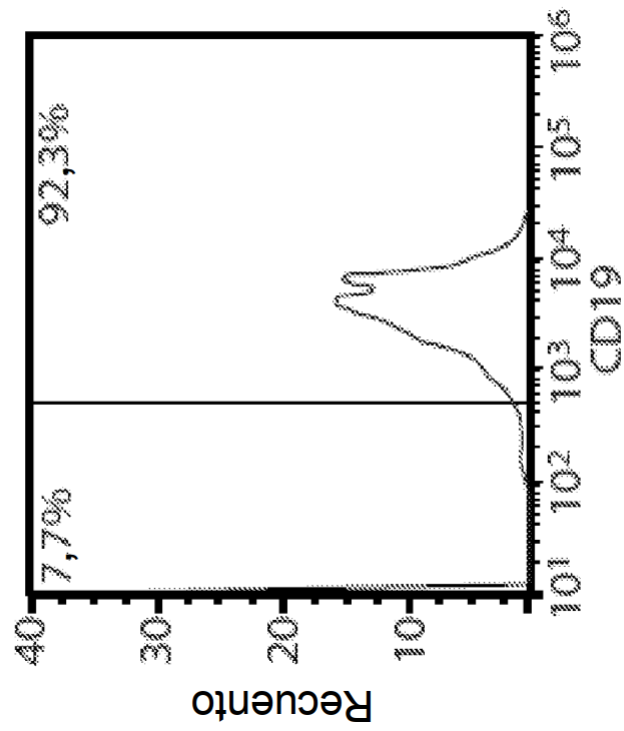


Figura 5D

Preterapia de CHOP101

CD45+>SSCbajo>CD34+



Recaída de CHOP101

CD45+>SSCbajo>CD34+

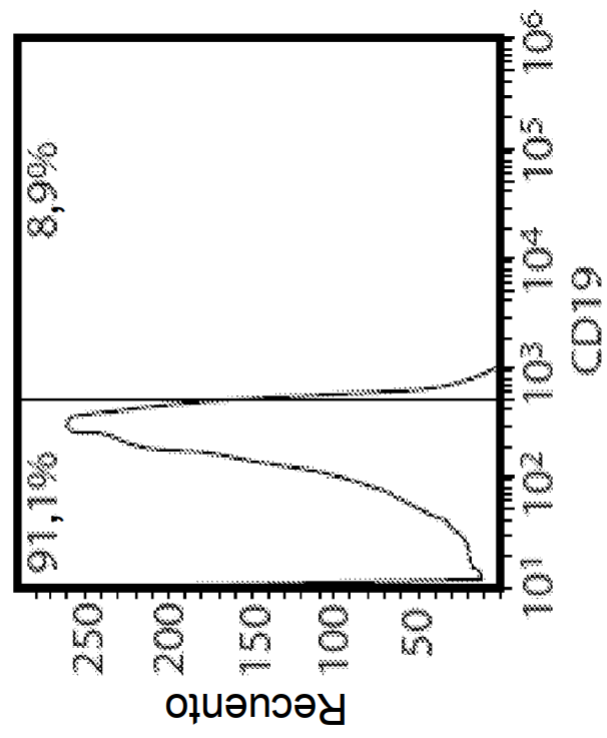
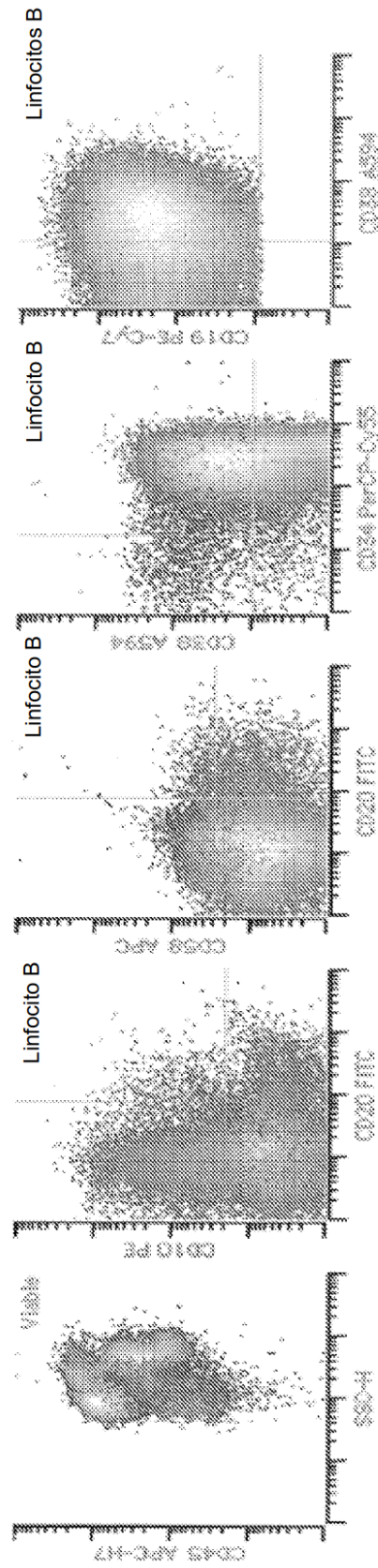


Figura 6

Inicio de CHOP-101



Día +23 de CHOP-101

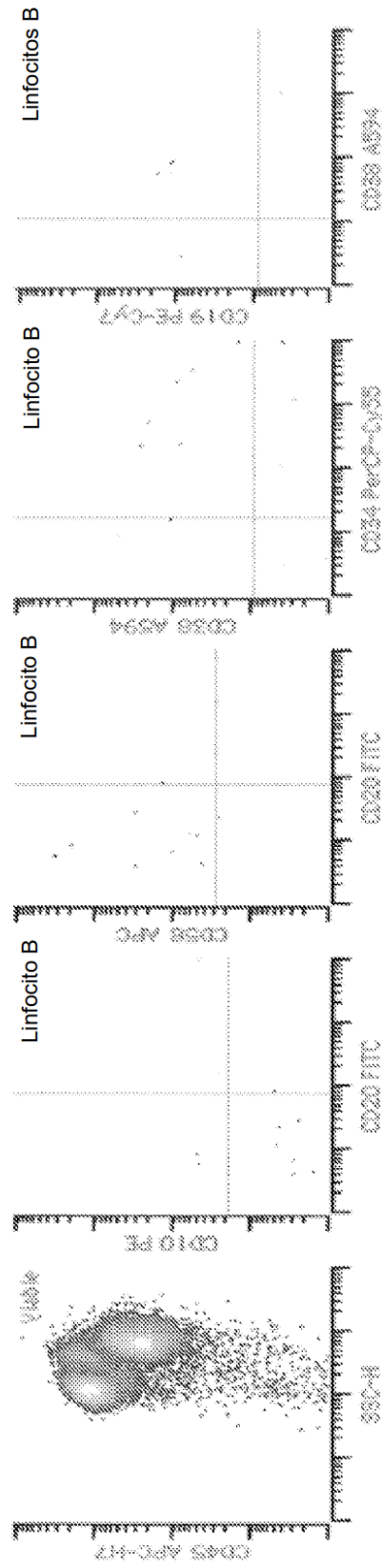


Figura 7

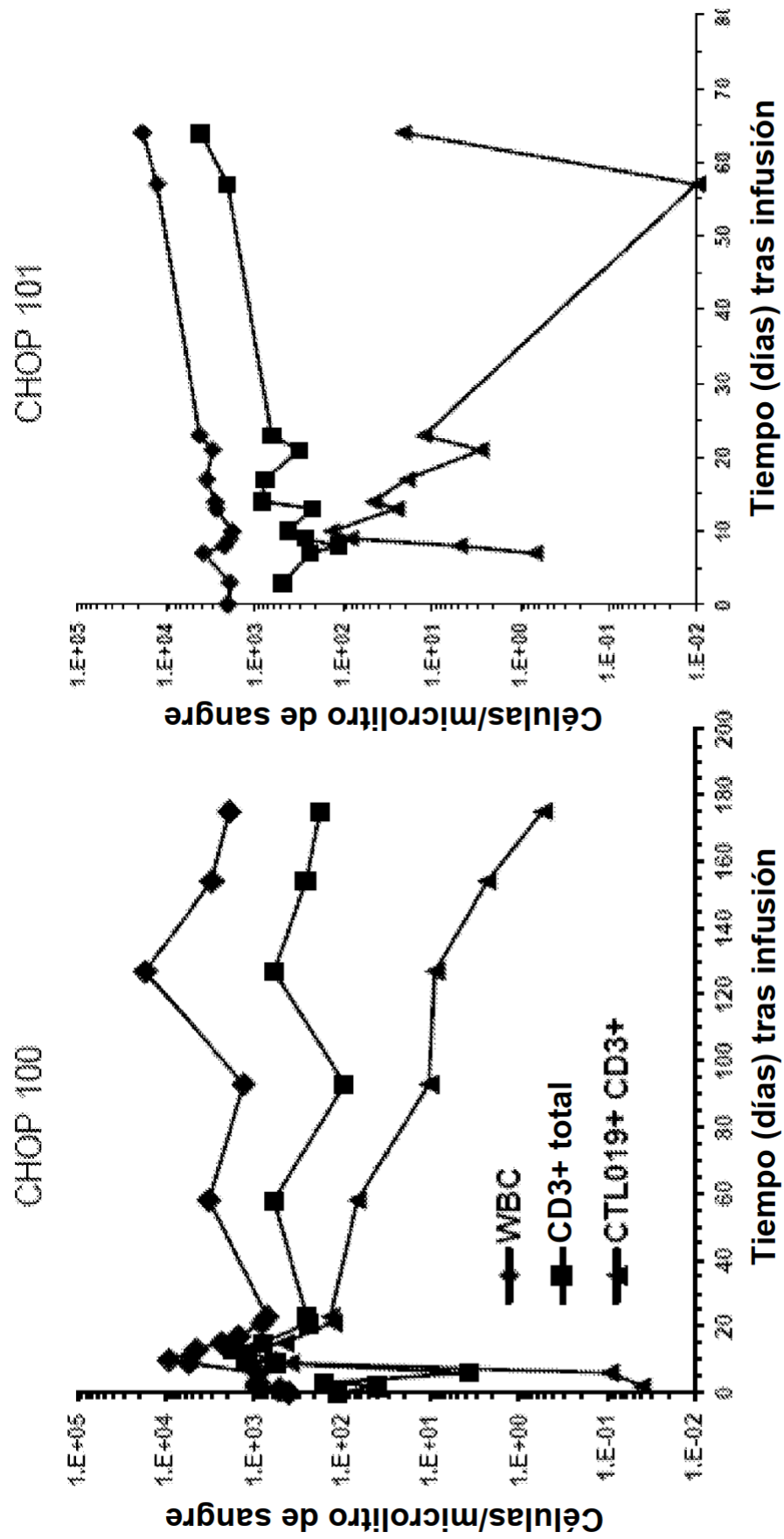


Figura 8

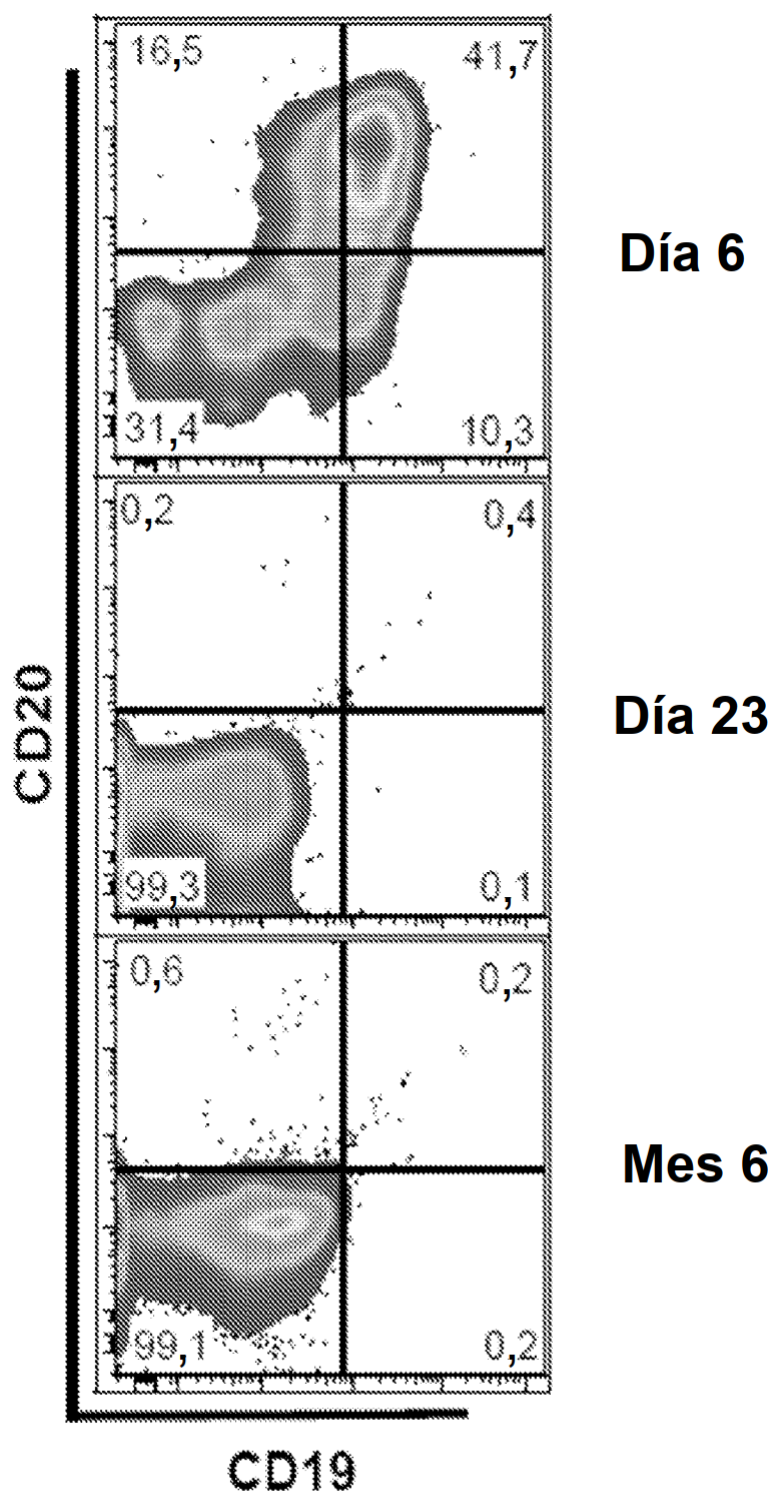


Figura 9A

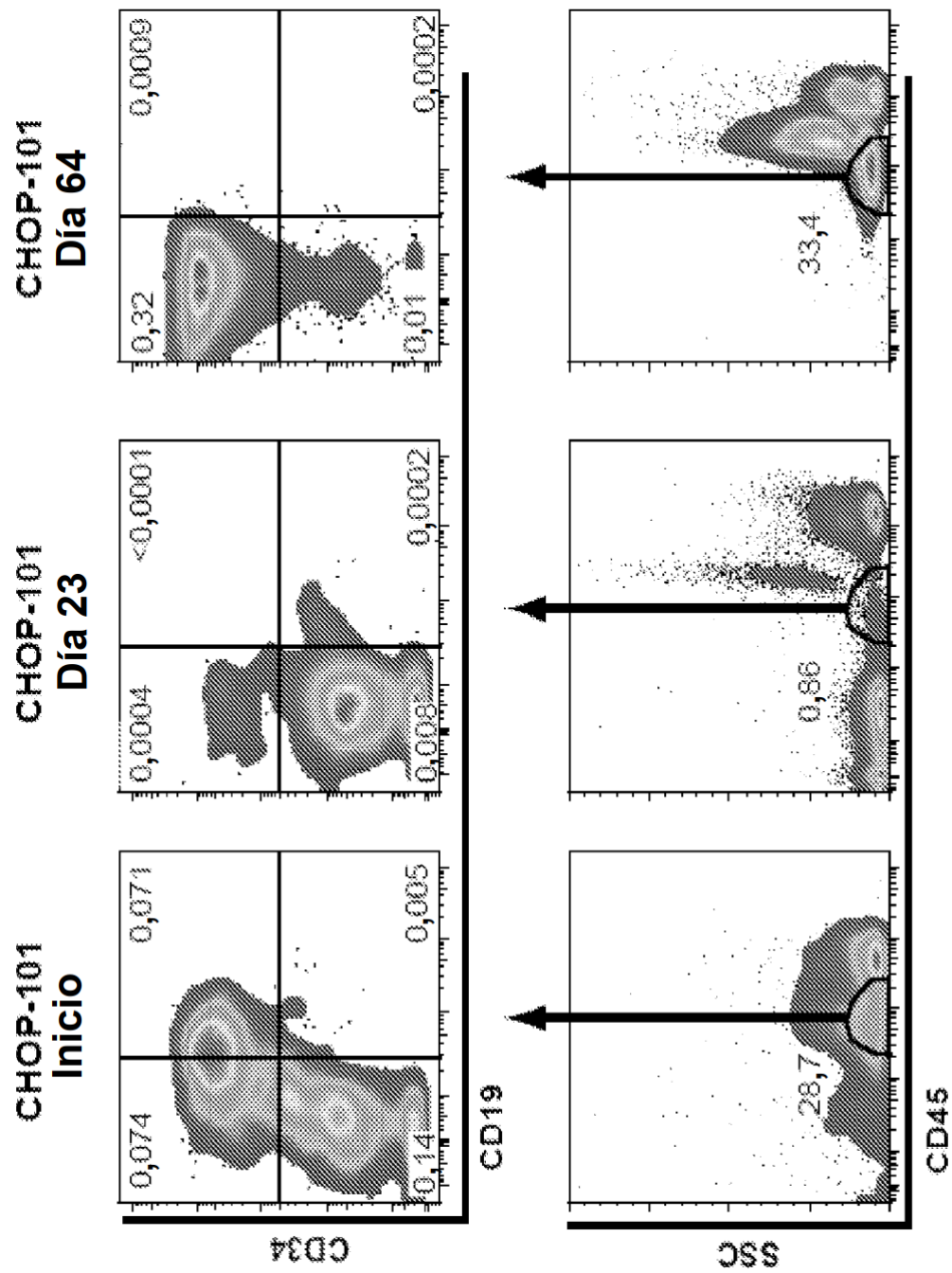


Figura 9B

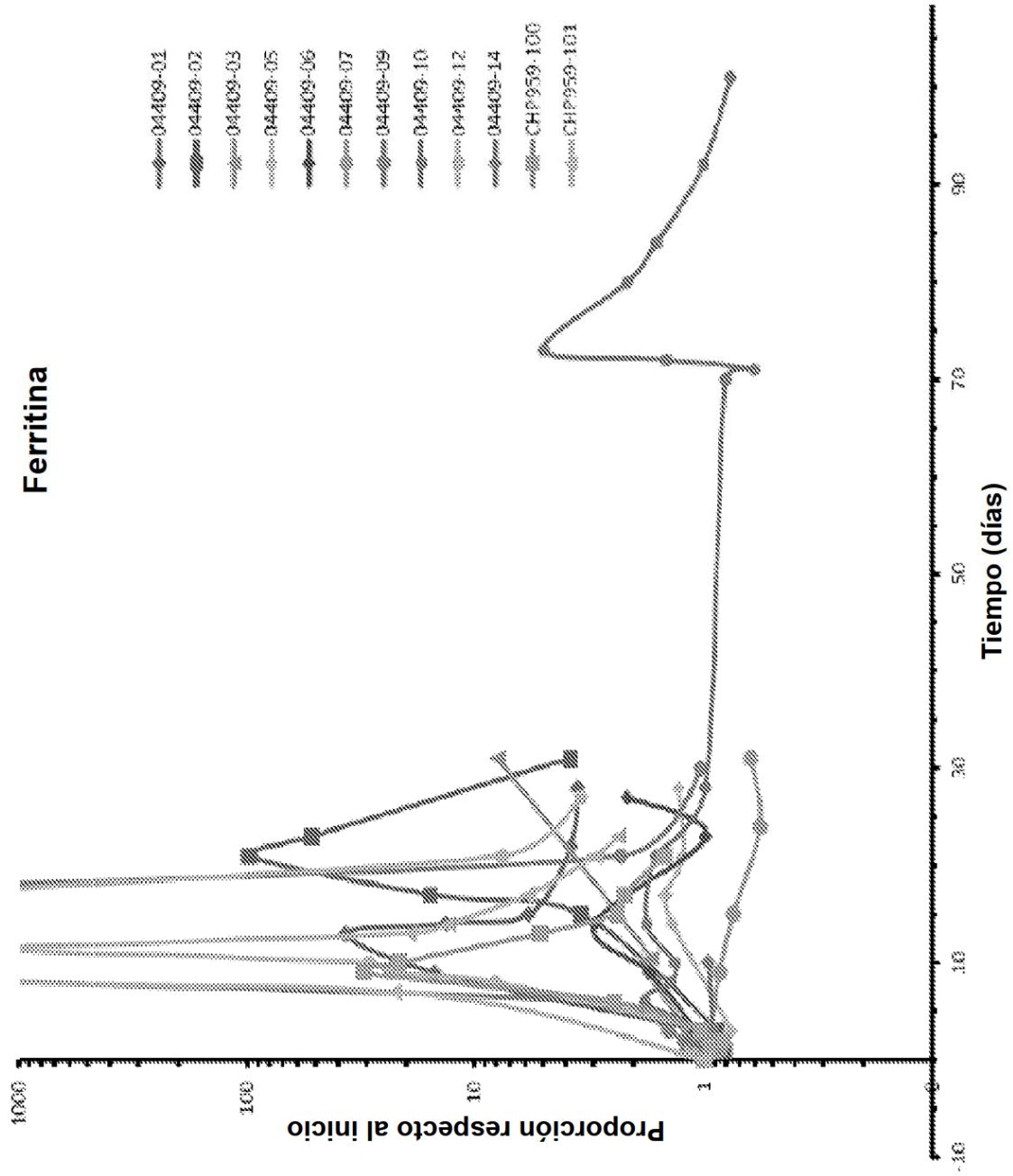


Figura 10

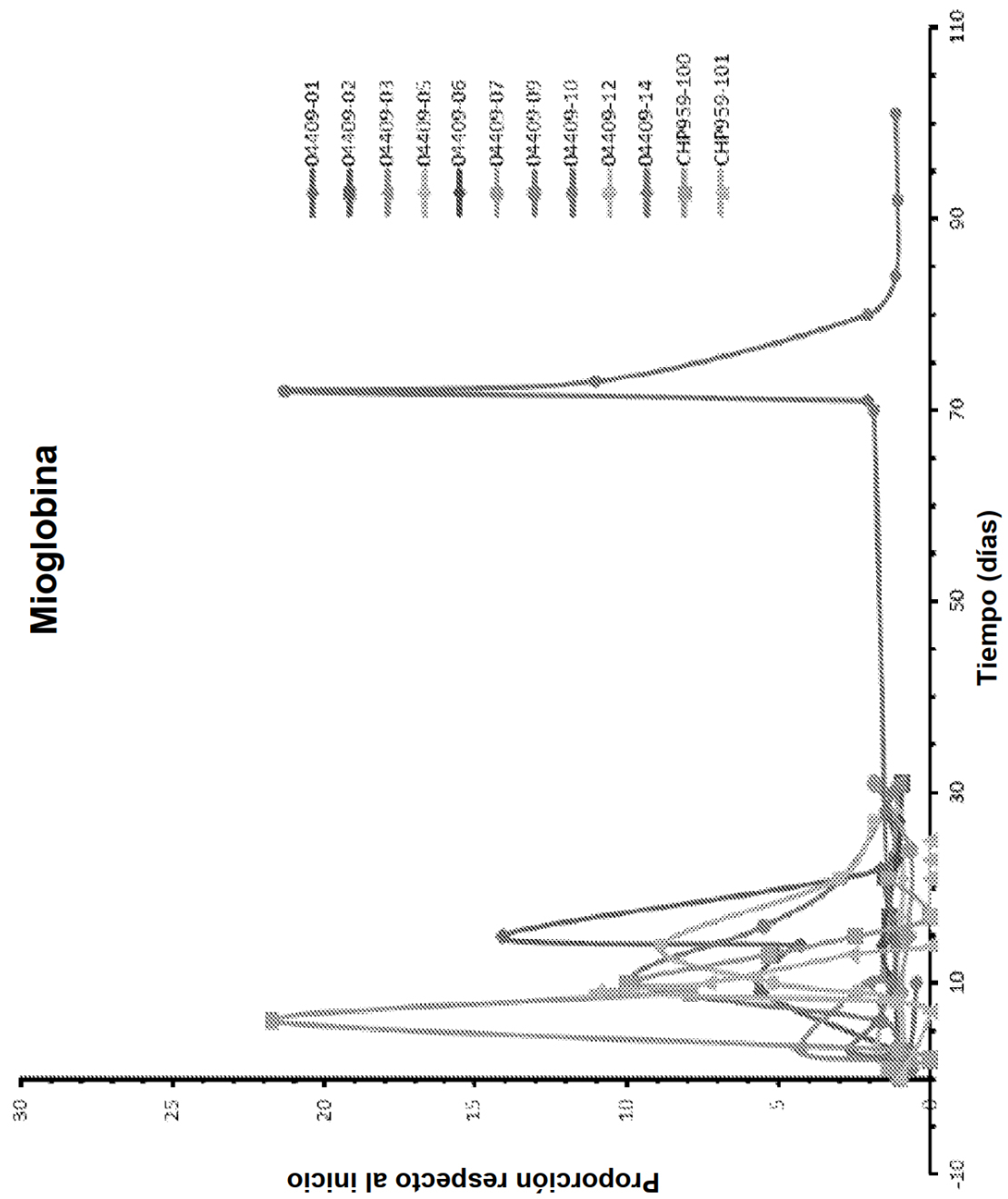


Figura 11

PAI-1 (inhibidor-1 del activador del plasminógeno)

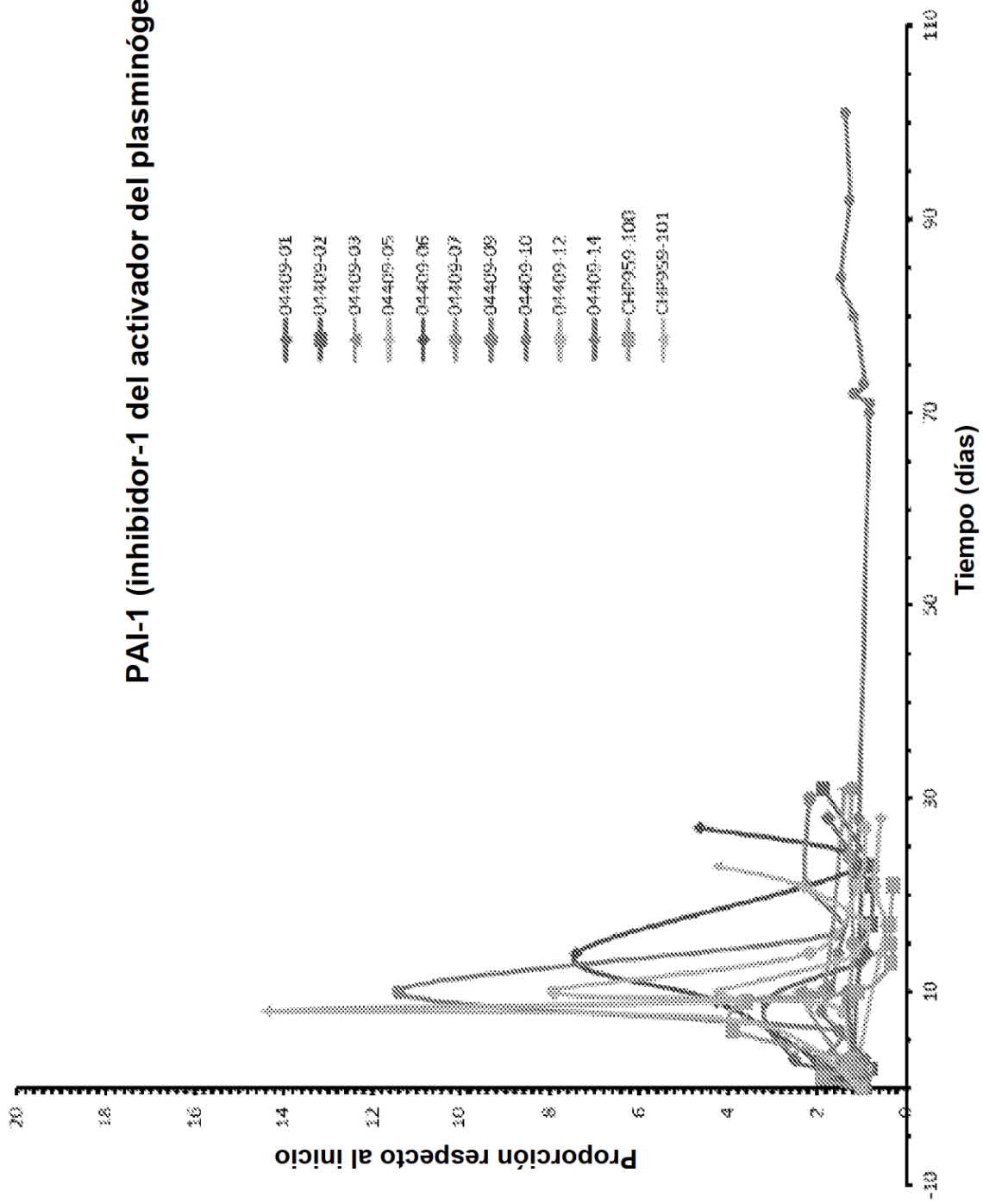


Figura 12