

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 073**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 14/705</b>	(2006.01)	<b>C12N 7/00</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/30</b>	(2006.01)	<b>C12N 15/86</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/85</b>	(2006.01)		
<b>C12N 5/00</b>	(2006.01)		
<b>C12N 5/071</b>	(2010.01)		
<b>C07K 16/28</b>	(2006.01)		
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)		
<b>A61K 48/00</b>	(2006.01)		
<b>C07K 14/725</b>	(2006.01)		
<b>C12N 5/0783</b>	(2010.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2015 PCT/US2015/027539**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2015 WO15164759**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2015 E 15782739 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 3134432**

54 Título: **Receptores de antígenos quiméricos del promotor MND**

30 Prioridad:

**25.04.2014 US 201461984561 P**

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

**28.08.2020**

73 Titular/es:

**BLUEBIRD BIO, INC. (100.0%)  
60 Binney Street  
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**MORGAN, RICHARD;  
FRIEDMAN, KEVIN y  
RYU, BYOUNG**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 781 073 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Receptores de antígenos quiméricos del promotor MND

5 **Antecedentes****Campo técnico**

10 La presente revelación se refiere a composiciones y métodos mejorados para tratar un cáncer o tumor. Más concretamente, la presente revelación se refiere a vectores mejorados que comprenden receptores de antígenos quiméricos (CAR), células efectoras inmunes modificadas genéticamente con los vectores para expresar estos CAR, y el uso de estas composiciones para tratar eficazmente diversos cánceres o tumores.

15 **Descripción de la técnica relacionada**

El cáncer es un problema de salud importante en todo el mundo. Según las tasas de 2008-2010, al 40,76% de los hombres y mujeres que nacen hoy en día se le diagnosticará algún tipo de cáncer en algún momento de su vida. El 20,37% de los hombres desarrollarán cáncer entre los 50 y 70 años, comparado con el 15,30% de las mujeres. El 1 de enero de 2010, en Estados Unidos había aproximadamente 13.027.914 hombres y mujeres vivos con antecedentes de cáncer: 6.078.974 hombres y 6.948.940 mujeres. Se estima que a 1.660.290 hombres y mujeres (854.790 hombres y 805.500 mujeres) en Estados Unidos se les diagnosticará cáncer y 580.350 hombres y mujeres morirán de cáncer de todo tipo en 2013. Howlader *et al.* 2013. SATIRO NAKAMURA DE OLIVEIRA *et al.*: La publicación "Modification of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells with CD19-Specific Chimeric Antigen Receptors as a Novel Approach for Cancer Immunotherapy", HUMAN GENE THERAPY, Vol. 24, Nº 10, 1 de octubre de 2013, P824-839, analiza la transferencia de genes a células madre/progenitoras hematopoyéticas como un enfoque para generar CARs específicos de CD19.

Aunque se han logrado avances en la detección, prevención y tratamiento del cáncer, todavía no se ha desarrollado una estrategia terapéutica de éxito universal. La respuesta de las diversas formas de tratamiento del cáncer es mixta. Los métodos tradicionales de tratamiento del cáncer, incluyendo la quimioterapia y la radioterapia, tienen una utilidad limitada debido a los efectos secundarios tóxicos. La inmunoterapia con anticuerpos terapéuticos también ha tenido un éxito limitado, debido en parte a los deficientes perfiles farmacocinéticos, la rápida eliminación de los anticuerpos por las proteasas séricas y la filtración en el glomérulo, y la limitada penetración en el sitio del tumor y los niveles de expresión del antígeno diana en las células tumorales. Los intentos de utilizar células modificadas genéticamente que expresen receptores de antígenos quiméricos (CAR) también han tenido un éxito limitado debido a la escasa expansión *in vivo* de los linfocitos T CAR, la rápida desaparición de las células después de la infusión y una actividad clínica decepcionante.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de composiciones y métodos más eficaces clínicamente para el tratamiento del cáncer.

40 **Breve resumen**

La presente revelación proporciona de forma generalizada composiciones mejoradas de los vectores para generar linfocitos T terapéuticos.

45 En varios ejemplos, se proporciona un polinucleótido que comprende un promotor (MND) potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo, con la región de control negativo eliminada y el sitio de unión al cebador dl587rev sustituido enlazado operativamente a un receptor de antígenos quiméricos (CAR).

En los ejemplos en particular, un CAR comprende: un dominio extracelular que aglutina un antígeno seleccionado del grupo formado por: receptor de folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, 11-UR $\alpha$ , IL-13R $\alpha_2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, y VEGFR2; un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo formado por: CD8 $\alpha$ ; CD4, CD28, CD45, PD1 y CD152; uno o más dominios de señalización coestimuladores intracelulares seleccionados del grupo formado por: CD28, CD54 (ICAM), CD134 (OX40), CD137 (41BB), CD152 (CTLA4), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), y CD278 (ICOS); y un dominio de señalización primario de CD3  $\xi$ .

60

- En algunos ejemplos, el dominio extracelular comprende un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno que se une al antígeno.
- 5 En los ejemplos en particular, el fragmento de unión a anticuerpo o antígeno que une al polipéptido de cadena ligera kappa se selecciona del grupo formado por: una Ig de camello, Ig-NAR, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab)'2, fragmentos F(ab)'3, Fv, anticuerpo Fv monocatenario ("scFv"), bis-scFv, (scFv)2, minicuerpo, diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, proteína Fv estabilizada con disulfuro ("dsFv"), y anticuerpo de dominio único (sdAb, Nanocuerpo).
- 10 En ejemplos adicionales, el fragmento de unión a anticuerpo o antígeno que une el polipéptido de cadena ligera kappa es un scFv.
- En determinados ejemplos, el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo murino o un anticuerpo humanizado. En las realizaciones, el dominio transmembrana se deriva de CD8 $\alpha$ .
- 15 En ejemplos en particular, uno o más dominios de señalización coestimuladores seleccionados del grupo formado por: CD28, CD134 y CD137.
- En algunos ejemplos, el CAR comprende dos o más dominios de señalización coestimuladores seleccionados del grupo formado por: CD28, CD134 y CD137.
- 20 En algunos ejemplos, el uno o más dominios de señalización coestimuladores es el CD28.
- En ejemplos en particular, el uno o más dominios de señalización coestimuladores es el CD134.
- 25 En determinados ejemplos, el uno o más dominios de señalización coestimuladores es el CD137.
- En los ejemplos en particular, el CAR comprende además un polipéptido de región bisagra.
- En otros ejemplos, el polipéptido de región bisagra comprende una región bisagra PD1, CD152 o CD8 $\alpha$ .
- 30 En otros ejemplos, el polipéptido de región bisagra comprende una región bisagra PD1.
- En otros ejemplos, el polipéptido de región bisagra comprende una región bisagra de CD152.
- 35 En otros ejemplos, el polipéptido de región bisagra comprende una región bisagra de CD8 $\alpha$ . En algunos ejemplos, el CAR comprende además una región espaciadora.
- En ejemplos adicionales, el polipéptido de región espaciadora comprende una región CH2 y una región CH3 de IgG1.
- 40 En determinados ejemplos, el CAR comprende además un péptido señal.
- En ejemplos en particular, el péptido señal comprende un polipéptido señal de cadena pesada de la IgG1, un polipéptido señal CD8 $\alpha$  o un péptido señal alfa de un receptor de GM-CSF humano.
- 45 En algunos ejemplos, el polinucleótido codifica un CAR como se establece en cualquiera de las ID SEC. N°: 2 a 3.
- En varios ejemplos, se proporciona un vector que comprende el polinucleótido que codifica un CAR como se describe en cualquiera de los ejemplos anteriores, o en ejemplos descritos en otras partes del presente documento.
- 50 En otros ejemplos, el vector es un vector de expresión.
- En ejemplos adicionales, el vector es un vector viral.
- En ejemplos en particular, el vector es un vector retroviral.
- 55 En un primer aspecto de la invención, se proporciona un vector lentiviral, como se define en la reivindicación 1.
- En otras realizaciones, el vector lentiviral se selecciona del grupo formado esencialmente por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); el virus del Maedi-Visna (VMV); el virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV); el virus

de la anemia infecciosa equina (EIAV); el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV); el virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV); y el virus de la inmunodeficiencia en simios (SIV).

5 En determinadas realizaciones, el CAR comprende además una LTR retroviral izquierda (5'), una señal de empaquetamiento Psi ( $\Psi$ ), un flap de tracto/ADN de polipurina (cPPT/FLAP), un elemento de exportación retroviral; un promotor MND enlazado operativamente al CAR; y una LTR retroviral derecha (3').

En otras realizaciones, el CAR comprende además una secuencia heteróloga de poliadenilación.

10 En otras realizaciones, la secuencia de poliadenilación es una secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina o una secuencia de señal de poliadenilación de globina  $\beta$  de conejo.

En realizaciones particulares, el CAR comprende además un elemento regulatorio post-transcripcional del virus de la hepatitis B (HPRE) o un elemento regularorio post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE).

15 En algunas realizaciones, el promotor de la LTR 5' es sustituido por un promotor heterólogo.

En determinadas realizaciones, el promotor heterólogo es un promotor del citomegalovirus (CMV), un promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), o un promotor del virus del simio 40 (SV40).

20 En otras realizaciones, la LTR 5' o LTR 3' es una LTR lentiviral.

En realizaciones adicionales, la LTR 3' comprende una o más modificaciones.

25 En realizaciones particulares, la LTR 3' comprende una o más supresiones.

En determinadas realizaciones, la LTR 3' es una LTR autoinactivante (SIN).

30 En realizaciones particulares, el polinucleótido que codifica el CAR comprende una secuencia Kozak optimizada.

En varios ejemplos, se proporciona una célula efectora inmune que comprende el vector como se describe en cualquiera de los ejemplos anteriores, o en ejemplos descritos en otras partes del presente documento.

35 En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una célula efectora inmune que comprende el vector lentiviral del primer aspecto, tal como se define en la reivindicación 9. En algunas realizaciones, la célula efectora inmune es un linfocito T.

40 En varias realizaciones, se proporciona una composición que comprende la célula efectora inmune de las contempladas en cualquiera de las realizaciones anteriores, o realizaciones contempladas en otro lugar del presente documento y un excipiente fisiológicamente aceptable.

45 En varios ejemplos, se proporciona un método de generación de una célula efectora inmune que comprende la introducción en una célula efectora inmune del vector contemplado en el presente documento, la estimulación de las células y la inducción de las células para la proliferación en contacto con células con anticuerpos que se unen a CD3 y anticuerpos que se unen a CD28, generando así la célula efectora inmune.

En otros ejemplos, se estimulan e inducen las células efectoras inmunes para que proliferen antes de introducir el vector. En ejemplos particulares, las células efectoras inmunes comprenden linfocitos T.

50 En varios ejemplos, se proporciona un método de generar una célula efectora inmune que comprende un polinucleótido contemplado en el presente documento que comprende el aislamiento de células CD34<sup>+</sup> de médula ósea, de sangre del cordón umbilical o sangre periférica movilizada de un sujeto, y la introducción de un vector contemplado en el presente documento en las células CD34<sup>+</sup> aisladas.

55 En otros ejemplos, las células CD34<sup>+</sup> se preestiman con una o más citoquinas seleccionadas del grupo formado por un ligando FLT3, TPO, SCF, IL-3 e IL-6 antes de introducir el vector según se revela en el presente documento.

60 En varias realizaciones, se proporciona una composición destinada para el uso en un método de tratamiento del cáncer en un sujeto con necesidad del mismo, comprendiendo el método la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición.

- 5 En determinadas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo formado por un tumor de Wilms, un sarcoma de Ewing, un tumor neuroendocrino, un glioblastoma, un neuroblastoma, un melanoma, un cáncer de piel, un cáncer de mama, un cáncer de colon, un cáncer de recto, un cáncer de próstata, un cáncer de hígado, un cáncer de riñón, un cáncer de páncreas, un cáncer de pulmón, un cáncer biliar, un cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma medular de tiroides, cáncer de ovario, glioma, linfoma, leucemia, mieloma, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano y cáncer de vejiga urinaria.
- 10 En realizaciones particulares, el cáncer es un cáncer de páncreas y el dominio de unión extracelular se une a un epítipo de PSCA o MUC1.
- En otras realizaciones, el cáncer es un cáncer de vejiga y el dominio de unión extracelular se une a un epítipo de PSCA o MUC1.
- 15 En realizaciones particulares, el cáncer es un glioblastoma multiforme y el dominio de unión extracelular se une a un epítipo de EPHA2, EGFRvIII o CSPG4.
- 20 En realizaciones particulares, el cáncer es un cáncer de pulmón y el dominio de unión extracelular se une a un epítipo de PSCA o GD2. En determinadas realizaciones, el cáncer es un cáncer de mama y el dominio de unión extracelular se une a un epítipo de CSPG4 o HER2. En algunas realizaciones, el cáncer es un melanoma y el dominio de unión extracelular se une a un epítipo de CSPG4 o GD2.
- 25 En varias realizaciones, se proporciona una composición revelada en el presente documento destinada para el uso en un método de tratamiento de una neoplasia hematológica en un sujeto con necesidad del mismo, comprendiendo el método la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición.
- En otras realizaciones, la neoplasia hematológica es una neoplasia de linfocitos B seleccionada del grupo formado por: mieloma múltiple (MM), leucemia linfocítica crónica (CLL) o linfoma no hodgkiniano (NHL).
- 30 En realizaciones particulares, el MM se selecciona del grupo formado por: mieloma múltiple sintomático, mieloma múltiple latente, leucemia de células plasmáticas, mieloma no secretor, mieloma IgD, mieloma osteoesclerótico, plasmocitoma solitario de hueso y plasmocitoma extramedular.
- 35 En determinadas realizaciones, el NHL se selecciona del grupo formado por: linfoma de Burkitt, leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño (CLL/SLL), linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma folicular, linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico precursor de linfocitos B y linfoma de células del manto.
- 40 Las realizaciones preferentes de la invención en cualquiera de sus diversos aspectos son las que se describen a continuación o las que se definen en las sub-reivindicaciones.
- Breve descripción de las diversas vistas de las figuras**
- La **Figura 1** muestra la estructura de una construcción pMND-CD19 CAR (A) y una construcción pMND-kappa<sub>LC</sub> CAR (B).
- 45 La **Figura 2** muestra el mapa vectorial de pMND-CD19 CAR.
- La **Figura 3** muestra el mapa vectorial de pMND-kappa LC CAR.
- 50 La **Figura 4** muestra el número de copia vectorial (VCN) de las partículas lentivirales integradas de pMND-kappa LC CAR. El VCN se determinó por q-PCR nueve días después de la transducción. Cada círculo representa un cultivo único hecho en paralelo con cultivos de linfocitos T no modificados (cuadrados). Los datos mostrados procedían de 12 cultivos únicos compuestos de 6 donantes. La desviación media y la desviación estándar están representadas por la línea y las barras de error.
- 55 La **Figura 5** muestra la expresión kappa<sub>LC</sub> en linfocitos T transducidos con pMND-kappa<sub>LC</sub> CAR. La expresión CAR en linfocitos T se determinó por citometría de flujo de seis a nueve días después de la transducción. Cada círculo representa un cultivo único hecho en paralelo con cultivos de linfocitos T no modificados (cuadrados). Los datos mostrados procedían de 12 cultivos únicos compuestos de 6 donantes. La desviación media y la desviación estándar están representadas por la línea y las barras de error.
- 60

La **Figura 6** muestra la transducción y expresión comparable de CD19 CAR en linfocitos T transducidos con vectores lentivirales pMND- o pEFla-CD19 CAR. Estos vectores se utilizaron para transducir cultivos paralelos coincidentes de linfocitos T humanos primarios. La expresión CAR en linfocitos T se determinó por citometría de flujo seis días después de la transducción. El número de copia vectorial (VCN) de las partículas lentivirales integradas se determinó mediante q-PCR nueve días después de la transducción.

La **Figura 7** muestra una reactividad específica del tumor de linfocitos T modificados de pMND-kappaLC CAR. Los linfocitos T modificados se cocultivaron con células kappa+ Daudi o kappa- HDLM-2 durante 24 horas. La liberación de IFN- $\gamma$  específica del tumor se analizó con un ensayo ELISA. Los datos mostrados procedían de 5 cultivos únicos de linfocitos T de 4 donantes.

La **Figura 8** muestra la remisión de los tumores Daudi establecidos tras la transferencia adoptiva de linfocitos T modificados de pMND-kappaLC CAR. Los linfocitos T modificados se utilizaron para tratar ratones con tumores Daudi establecidos. La carga tumoral después del tratamiento se monitorizó con técnicas de imagen *in vivo* en comparación con los animales testigo no tratados. Los datos eran representativos de dos experimentos independientes.

La **Figura 9** muestra la remisión de un tumor específico de antígeno usando linfocitos T expresando CAR. (A). Los linfocitos T expresando CAR anti-BCMA mataron las células tumorales expresando BCMA marcadas con éster de succinimidil de carboxifluoresceína (CFSE); la fluorescencia fue medida con FACS. (B). Los linfocitos T expresando CAR anti-BCMA se cocultivaron con células K562 y células K562 modificadas genéticamente para expresar BCMA y los sobrenadantes se recogieron 24 horas después y se analizaron para la liberación de IFN- $\gamma$  mediante ensayo ELISA. (n=3).

#### Breve descripción de los identificadores de secuencia

**ID SEC. N°: 1** establece la secuencia de polinucleótidos del promotor (MND) potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo, con la región de control negativo eliminada y el sitio de unión del cebador dl587rev sustituido.

**ID SEC. N°: 2** establece la secuencia de polinucleótidos de una construcción anti-CD19 CAR del promotor MND.

**ID SEC. N°: 3** establece la secuencia de polinucleótidos de una construcción de cadena ligera anti-kappa CAR del promotor MND.

#### Descripción detallada

##### A. Descripción general

La revelación se refiere de forma generalizada a composiciones y métodos mejorados para tratar el cáncer, incluyendo entre otros, tumores o cánceres de hígado, páncreas, pulmón, mama, vejiga, cerebro, hueso, tiroides, riñón, piel y sistema hematopoyético. En particular, la revelación se refiere a la terapia celular adoptiva de células efectoras inmunes modificadas genéticamente con vectores que comprenden un promotor (MND) potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo, con región de control negativo eliminada y sitio de unión al cebador dl587rev sustituido enlazado operativamente a un receptor de antígenos quiméricos que codifican a un polinucleótido.

Los enfoques genéticos ofrecen un medio potencial para mejorar el reconocimiento inmunológico y la eliminación de células cancerosas. Una estrategia prometedora es la ingeniería genética de células efectoras inmunes para expresar receptores de antígenos quiméricos que redireccionan la citotoxicidad hacia las células tumorales. Sin embargo, las inmunoterapias celulares adoptivas existentes para tratar tumores o cánceres carecen de niveles persistentes de expresión suficiente de CARs en las células terapéuticas. Por consiguiente, dichas terapias no son clínicamente deseables y, por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de contar con terapias más eficaces para tratar neoplasias de linfocitos B que preserven la inmunidad humoral.

Las composiciones y métodos mejorados de terapia celular adoptiva revelados en el presente documento proporcionan células efectoras inmunes modificadas genéticamente que pueden expandirse fácilmente, manifiestan persistencia a largo plazo *in vivo*, y proporcionan una expresión persistente y suficiente de polipéptidos de CAR. Sin querer limitarse a ninguna teoría en particular, el presente documento contempla, en parte, el sorprendente hallazgo de que el promotor MND dirige la expresión persistente de polipéptidos de CAR en linfocitos T latentes, activados y expandidos, y que dicha expresión es suficiente para redirigir eficazmente las células efectoras inmunes modificadas genéticamente contempladas aquí para desencadenar la actividad citotóxica contra el tumor o la célula cancerosa.

En un ejemplo, un polinucleótido comprende un promotor MND enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un CAR, comprendiendo el CAR un dominio extracelular que se une a un antígeno diana, un dominio transmembrana, y uno o más dominios de señalización intracelular.

5 En un ejemplo, un linfocito T se modifica genéticamente con un vector que comprende un promotor MND enlazado operativamente a un CAR contemplado en el presente documento. Los linfocitos T expresando un CAR se denominan en el presente documento linfocitos T CAR o linfocitos T modificados por CAR. En varios ejemplos, los linfocitos T CAR modificados genéticamente contemplados aquí se administran a un paciente que tiene un cáncer o tumor.

10 En la práctica de la presente invención se emplearán, salvo indicación específicamente en contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, química orgánica, biología molecular, microbiología, técnicas de ADN recombinante, genética, inmunología y biología celular dentro de la capacidad de la técnica, muchos de los cuales se describen a continuación con fines ilustrativos. Dichas técnicas se explican plenamente en las publicaciones. Ver, *por ej.*, Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª edición, 2001); Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, 1989); Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, actualizada en julio de 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); Harlow y Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) *Current Protocols in Immunology* Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach y W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology; as well as monographs in journals such as Advances in Immunology*.

25 **B. Definiciones**

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que comúnmente entienden los expertos en la técnica la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento puede utilizarse en la práctica o en el ensayo de la materia revelada, los ejemplos preferentes de composiciones, métodos y materiales descritos aquí. A efectos de la presente invención, se definen los siguientes términos a continuación.

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

Tal como se utiliza aquí, el término "alrededor de" o "aproximadamente" se refiere a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía hasta en un 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1% de una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia. En ejemplos en particular, los términos "alrededor de" o "aproximadamente" cuando preceden a un valor numérico indican el valor más o menos un margen de un 15%, 10%, 5% o 1%.

A lo largo del documento, salvo que el contexto exija otra cosa, se entenderá que las palabras "comprende", "comprenden" y "comprendiendo" implican la inclusión de un paso o elemento o grupo de pasos o elementos declarados, pero no la exclusión de ningún otro paso o elemento o grupo de pasos o elementos. Por "consistente en" se entiende "incluyendo, y limitado a," lo que sigue a la frase "consistente en". Así pues, la frase "consistente en" indica que los elementos enunciados son necesarios u obligatorios, y que no puede haber otros elementos presentes. Por "consistente esencialmente en" se entiende que incluye cualquier elemento enunciado después de la frase, y limitado a otros elementos que no interfieren ni contribuyen a la actividad o acción especificada en la revelación de los elementos enunciados. Así pues, la frase "consistente esencialmente en" indica que los elementos enunciados son necesarios u obligatorios, pero que ningún otro elemento es opcional y puede o no estar presente, según afecte o no a la actividad o la acción de los elementos enunciados.

La referencia a lo largo del documento a "una realización", "una realización", "una realización en particular", "una realización relacionada", "una cierta realización", "una realización adicional" o "más de una realización" o combinaciones de estas significa que una función, estructura o característica particular descrita en relación con la realización está incluida en al menos una realización de la presente invención. Por tanto, las apariciones de las frases anteriores en varios lugares a lo largo del documento no se refieren necesariamente todas a la misma realización. Además, las funciones, estructuras o características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

60 **C. Receptores de antígenos quiméricos**

En este documento se revelan células efectoras inmunes diseñadas genéticamente con vectores diseñados para expresar receptores de antígenos quiméricos que redireccionen la citotoxicidad hacia las células tumorales. Estos receptores diseñados genéticamente se denominan receptores de antígenos quiméricos (CARs) en el presente documento. Los CARs son moléculas que combinan la especificidad basada en anticuerpos para un antígeno diana (*por ej.*, un antígeno tumoral) con un dominio intracelular activador del receptor de linfocitos T para generar una proteína quimérica que presenta una actividad inmunitaria celular antitumoral específica. Tal como se utiliza aquí, el término "quimérico" describe el hecho de estar compuesto por partes de diferentes proteínas o ADN de diferentes orígenes.

Los vectores contemplados aquí comprenden un promotor MND y un polinucleótido que codifica un CAR. Los CARs contemplados aquí comprenden un dominio extracelular que se une a un antígeno diana específico (también denominado dominio de unión o dominio de unión específica a antígeno), un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. La unión del dominio de unión a antígeno del CAR con su antígeno diana en la superficie de una célula diana resulta en el agrupamiento del CAR y genera un estímulo de activación a la célula que contiene CAR. La principal característica de los CARs es su capacidad de redirigir la especificidad de las células efectoras inmunes, desencadenando así la proliferación, la producción de citoquinas, la fagocitosis o la producción de moléculas que pueden mediar la muerte celular del antígeno diana que expresa la célula de manera independiente de la histocompatibilidad principal (HMC), explotando las capacidades diana específicas de células de los anticuerpos monoclonales, los ligandos solubles o los correceptores específicos de células.

En ejemplos particulares, un CAR comprende un dominio de unión extracelular que incluye entre otros, un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno de este, un ligando atado, o el dominio extracelular de un correceptor, que une específicamente un antígeno diana seleccionado del grupo formado por: receptor de folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha_2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, y VEGFR2; uno o más dominios bisagra o dominios espaciadores; un dominio transmembrana que incluye entre otros, dominios transmembrana de CD8 $\alpha$ , CD4, CD45, PD1 y CD152; uno o más dominios de señalización coestimuladores intracelulares, incluyendo entre otros, los dominios de señalización coestimuladores intracelulares de CD28, CD54 (ICAM), CD134 (OX40), CD137 (41BB), CD152 (CTLA4), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1) y CD278 (ICOS); y un dominio de señalización primario de CD3 $\xi$  o FcR $\gamma$ .

### 1. Dominio de unión

En ejemplos particulares, los CARs contemplados aquí comprenden un dominio de unión extracelular que se une específicamente a un polipéptido diana, *por ej.*, un antígeno diana, expresado en una célula tumoral. Tal como se usan aquí, los términos "dominio de unión", "dominio extracelular", "dominio de unión extracelular", "dominio de unión específica a antígeno" y "dominio de unión específica a antígeno extracelular" se utilizan indistintamente y proporcionan a un CAR la capacidad de unirse específicamente al antígeno diana de interés. Un dominio de unión puede comprender cualquier proteína, polipéptido, oligopéptido o péptido que posea la capacidad de reconocer y unirse específicamente a una molécula biológica (*por ej.*, un receptor de superficie de la célula o una proteína tumoral, un lípido, un polisacárido, u otra molécula diana de superficie de la célula, o un componente de esta). Un dominio de unión incluye cualquier elemento de unión producido de manera natural, sintética, semisintética o recombinante para una molécula biológica de interés.

Los términos "afinidad de unión específica" o "une específicamente" o "vincula específicamente" o "unión específica" o "se refiere específicamente" tal como se utilizan aquí, describen la unión de una molécula a otra con mayor afinidad de unión que la unión de fondo. Un dominio de unión (o un CAR que comprende un dominio de unión o una proteína de fusión que contiene un dominio de unión) "se une específicamente" a una molécula diana si se une o asocia con una molécula diana con una afinidad o  $K_a$  (*es decir*, una constante de asociación de equilibrio de una interacción de unión particular con unidades de 1/M) de, *por ej.*, mayor o igual a unos  $10^5 \text{ M}^{-1}$ . En determinadas realizaciones, un dominio de unión (o una proteína de fusión de este) se une a una diana con una  $K_a$  mayor o igual a unos  $10^9 \text{ M}^{-1}$ ,  $10^7 \text{ M}^{-1}$ ,  $10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $10^9 \text{ M}^{-1}$ ,  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ ,  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ ,  $10^{12} \text{ M}^{-1}$ , o  $10^{13} \text{ M}^{-1}$ . Los dominios de unión de "alta afinidad" (o sus proteínas de fusión monocatenarias) se refieren a aquellos dominios de unión con una  $K_a$  de al menos  $10^7 \text{ M}^{-1}$ ,  $10^8 \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^{12} \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^{13} \text{ M}^{-1}$ , o mayor.

Alternativamente, la afinidad puede definirse como una constante de disociación de equilibrio ( $K_d$ ) de una interacción de unión particular con unidades de M (*por ej.*,  $10^{-5} \text{ M}$  to  $10^{-13} \text{ M}$ , o menos). Las afinidades de los polipéptidos de dominio de unión y las proteínas de CAR según el presente documento pueden determinarse fácilmente con técnicas convencionales,

por ej., ensayos ELISA competitivos (ensayos inmunoenzimáticos de unión), o por asociación de unión, o ensayos de desplazamiento que usan ligandos marcados, o utilizando un dispositivo de resonancia del plasmón de superficie como el Biacore T100, que puede obtenerse en Biacore, Inc, Piscataway, NJ, o la tecnología de biosensores ópticos como el sistema EPIC o EnSpire, que pueden obtenerse en Corning y Perkin Elmer respectivamente (ver también, por ej., Scatchard *et al.* (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660; y las patentes USA N° 5.283.173; 5.468.614, o su equivalente).

En una realización, la afinidad de la unión específica es alrededor de 2 veces mayor que la unión de fondo, alrededor de 5 veces mayor que la unión de fondo, alrededor de 10 veces mayor que la unión de fondo, alrededor de 20 veces mayor que la unión de fondo, alrededor de 50 veces mayor que la unión de fondo, alrededor de 100 veces mayor que la unión de fondo, o alrededor de 1000 veces mayor que la unión de fondo o más.

En ejemplos particulares, el dominio de unión extracelular de un CAR comprende un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno del mismo. Por "anticuerpo" se entiende un aglutinante que es un polipéptido que comprende por lo menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o de cadena pesada que reconoce y se une específicamente a un epítipo de un antígeno, como un péptido, lípido, polisacárido o ácido nucleico que contiene un determinante antigénico, como los que reconoce una célula inmune.

Un "antígeno (Ag)" se refiere a un compuesto, composición o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de los linfocitos T en un animal, incluyendo composiciones (como la que incluye una proteína específica de un tumor) que se inyectan o absorben en un animal. Un antígeno reacciona con los productos de una inmunidad humoral o celular específica, incluyendo aquellos inducidos por antígenos heterólogos, como los antígenos revelados. Un "antígeno diana" o "antígeno diana o de interés" es un antígeno para el que un dominio de unión de un CAR contemplado aquí está diseñado para unirse. En realizaciones particulares, el antígeno diana es un epítipo de un péptido, lípido, polisacárido o ácido nucleico, al que se une específicamente el dominio de unión. En una realización preferente, el antígeno es un epítipo de un receptor folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRVIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha_2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, o un polipéptido VEGFR2.

Un "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a la región de un antígeno a la que se une un aglutinante. Los epítopos pueden estar formados tanto por aminoácidos contiguos como por aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados por aminoácidos contiguos se conservan típicamente al exponerse a disolventes desnaturalizados, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente al tratarse con disolventes desnaturalizados. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, y más comúnmente, al menos 5, alrededor de 9, o alrededor de 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

Los anticuerpos incluyen fragmentos de unión a antígeno de estos, como un Ig de camello, Ig-NAR, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab)'2, fragmentos F(ab)'3, Fv, proteínas Fv monocatenarias ("scFv"), bis-scFv, (scFv)'2, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, proteínas Fv estabilizadas con disulfuro ("dsFv"), y anticuerpos de un solo dominio (sdAb, Nanocuerpo) y porciones de anticuerpos de longitud completa responsables de la unión a antígeno. El término también incluye formas diseñadas genéticamente como los anticuerpos quiméricos (por ej., anticuerpos murinos humanizados), anticuerpos heteroconjugados (como anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de unión a antígeno de estos. Ver también Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3.<sup>a</sup> edición, W. H. Freeman & Co., New York, 1997.

Como conoce un experto en la materia y como se describe en otra parte del presente documento, un anticuerpo completo comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena pesada consta de una región variable y una primera, segunda y tercera región constante, mientras que cada cadena ligera consta de una región variable y una región constante. Las cadenas pesadas de los mamíferos se clasifican como  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$ , y las cadenas ligeras de los mamíferos se clasifican como  $\lambda$ , o  $\kappa$ .

Las inmunoglobulinas que comprenden los  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$ , y las cadenas pesadas se clasifican como inmunoglobulina (Ig)A, IgD, IgE, IgG e IgM. El anticuerpo completo tiene forma de "Y". El tallo de la Y consiste en la segunda y tercera regiones constantes (y para la IgE y la IgM, la cuarta región constante) de dos cadenas pesadas unidas entre sí y forman enlaces disulfuro (intracatenarios) en la bisagra. Las cadenas pesadas  $\gamma$ ,  $\alpha$  y  $\delta$  tienen una región constante compuesta de tres tándem (en una línea) de dominios Ig, y una región bisagra para mayor flexibilidad; las cadenas pesadas  $\mu$  y  $\epsilon$  tienen una región constante compuesta de cuatro dominios de inmunoglobulina. La segunda y tercera regiones constantes se denominan "dominio CH2" y "dominio CH3", respectivamente. Cada brazo de la Y incluye la región variable y la primera

región constante de una única cadena pesada unida a las regiones variable y constante de una única cadena ligera. Las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas son responsables de la unión a antígeno.

5 Las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas contienen una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables, también llamadas "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDRs". Las CDRs pueden definirse o identificarse por métodos convencionales, por ej., mediante una secuencia según Kabat *et al.* (Wu, TT y Kabat, E. A., J Exp Med. 132(2):211-50, (1970); Borden, P. y Kabat E. A., PNAS, 84: 2440-2443 (1987); (ver Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991), o por estructura según Chothia *et al.* (Chothia, C. y Lesk, A.M., J Mol. Biol, 196(4): 901-917 (1987), Chothia, C. *et al.*, Nature, 342: 877-883 (1989)).

15 Las secuencias de las regiones marco de las diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie, como los humanos. La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDRs en el espacio tridimensional. Las CDRs son las principales responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDRs de cada cadena se denominan típicamente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente a partir del terminal N, y también se identifican típicamente por la cadena en la que se encuentra la CDR particular. Así, las CDR situadas en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo se denominan CDRH1, CDRH2 y CDRH3, mientras que las CDRs situadas en el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo se denominan CDRL1, CDRL2 y CDRL3. Los anticuerpos con diferentes especificidades (es decir, diferentes sitios de combinación para diferentes antígenos) tienen diferentes CDRs. Aunque son las CDRs las que varían de un anticuerpo a otro, solo un número limitado de posiciones de aminoácidos dentro de las CDRs están directamente involucradas en la unión a antígeno. Estas posiciones dentro de las CDRs se denominan residuos determinantes de la especificidad (SDRs).

25 Las referencias a "Vh" o "VH" se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulinas, incluyendo la de un anticuerpo, Fv, scFv, dsFv, Fab, u otro fragmento de anticuerpo como se revela en el presente documento. Las referencias a "Vl" o "VL" se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulinas, incluyendo la de un anticuerpo, Fv, scFv, dsFv, Fab, u otro fragmento de anticuerpo como se revela en el presente documento.

30 Un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo producido mediante un único clon de linfocitos B o mediante una célula a la que se han transfectedo los genes de cadena ligera y pesada de un único anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen con métodos conocidos para los expertos en la materia, por ej., produciendo células híbridas que forman anticuerpos a partir de una fusión de células de mieloma con células inmunitarias de bazo. Los anticuerpos monoclonales incluyen los anticuerpos monoclonales humanizados.

35 Un "anticuerpo quimérico" tiene residuos marco de una especie, por ej., la humana, y las CDRs (que generalmente confieren la unión a antígeno) de otra especie, como los ratones. En ejemplos concretos preferentes, un CAR contemplado aquí comprende un dominio de unión específica a antígeno que es un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno quimérico de este.

40 En determinados ejemplos preferentes, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado (como un anticuerpo monoclonal humanizado) que se une específicamente a una proteína de superficie en una célula tumoral. Un anticuerpo "humanizado" es una inmunoglobulina que incluye una región marco humana y una o más CDRs de una inmunoglobulina no humana (por ej., de ratón, rata o sintética). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDRs se denomina "donante", y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se denomina "aceptador". En un ejemplo, todas las CDRs proceden de la inmunoglobulina donante en una inmunoglobulina humanizada. No es necesario que las regiones constantes estén presentes, pero si lo están, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de la inmunoglobulina humana, es decir, al menos alrededor del 85-90%, como alrededor del 95% o más idénticas. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDRs, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de inmunoglobulina humana natural. Los anticuerpos humanizados u otros anticuerpos monoclonales pueden tener sustituciones conservadoras adicionales de aminoácidos, que no tienen prácticamente ningún efecto en la unión a antígeno u otras funciones de la inmunoglobulina. Los anticuerpos humanizados pueden construirse mediante ingeniería genética (ver, por ej., la patente USA N° 5.585.089).

55 En un ejemplo en particular, el dominio de unión extracelular de un CAR comprende un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno de este, incluyendo entre otros, una Ig de camello (un anticuerpo de camélido [VHH]), Ig-NAR, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab)'2, fragmentos F(ab)'3, Fv, anticuerpo Fv monocatenario ("scFv"), bis-scFv, (scFv)'2, minicuerpo, diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, proteína Fv estabilizada con disulfuro ("dsFv"), y anticuerpo de dominio único (sdAb, Nanocuerpo).

60

"Ig de camello" o "VHH de camélido", como se utiliza aquí, se refiere a la unidad más pequeña conocida de unión a antígenos de un anticuerpo de cadena pesada (Koch-Nolte, *et al.*, FASEB J., 21: 3490-3498 (2007)). Un "anticuerpo de cadena pesada" o un "anticuerpo de camélido" se refiere a un anticuerpo que contiene dos dominios VH y ninguna cadena ligera (Riechmann L. *et al.*, J. Immunol. Methods 231:25-38 (1999); WO94/04678; WO94/25591; patente de EE. UU. N° 6.005.079).

"IgNAR" de "inmunoglobulinas con nuevo receptor de antígeno" se refiere a la clase de anticuerpos del repertorio inmunológico de tiburón que consiste en homodímeros de un dominio de nuevo receptor de antígeno variable (VNAR) y cinco dominios de nuevo receptor de antígeno constantes (CNAR). Las IgNAR representan algunos de los más pequeños armazones de proteínas basados en inmunoglobulinas conocidos y son altamente estables y poseen características de unión eficientes. La estabilidad inherente puede atribuirse tanto a (i) el armazón de Ig subyacente, que presenta un número considerable de residuos cargados y residuos hidrofílicos expuestos a la superficie en comparación con los dominios VH y VL de anticuerpos convencionales que se encuentran en los anticuerpos murinos; y (ii) las características estructurales estabilizadoras en los bucles de la región determinante de la complementariedad (CDR), incluyendo los puentes disulfuro entre bucles, y los patrones de los enlaces de hidrógeno entre bucles.

La digestión de papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno llamados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión a antígeno, y un fragmento residual "Fc", cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento de pepsina produce un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de combinación de antígeno y aún es capaz de entrecruzar el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En un ejemplo, una especie Fv de dos cadenas consiste en un dímero de dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación no covalente estrecha. En una especie Fv monocatenaria, un dominio variable de cadena ligera y uno de cadena pesada se pueden unir covalentemente mediante un enlace peptídico flexible de modo que las cadenas ligera y pesada se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie Fv bicatenaria. Es en esta configuración donde las tres regiones hipervariables (HVR) de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis HVR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprende solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y de cadena ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CHI) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio CHI de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en la que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')<sub>2</sub> se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen en la técnica otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

El término "diacuerpos" se refiere a los fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Al utilizar un enlace demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, los dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen con más detalle en, por ej., EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson *et al.*, Nat. Med. 9:129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, PNAS USA 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetraacuerpos también se describen en Hudson *et al.*, Nat. Med. 9:129-134 (2003).

"Anticuerpo de dominio único" o "sdAb" o "nanocuerpo" se refiere a un fragmento de anticuerpo que consiste en la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo (dominio VH) o la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo (dominio VL) (Holt, L., *et al.*, Trends in Biotechnology, 21(11): 484-490).

Los fragmentos de anticuerpo "Fv" o "scFv" monocatenarios comprenden los dominios de anticuerpo VH y VL, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica y en cualquiera de sus orientaciones (*por ej.*, VL-VH o VH-VL). En general, el polipéptido scFv comprende además un polipéptido enlace entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para revisar el scFv, ver, *por ej.*, Pluckthiin, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York, 1994), págs. 269-315.

En las realizaciones, un CAR contemplado en el presente documento comprende un dominio de unión específica a antígeno que es un scFv y puede ser un scFv murino, humano o humanizado. Los anticuerpos monocatenarios pueden

clonarse a partir de los genes de la región V de un hibridoma específico para un objetivo deseado. La producción de dichos hibridomas se ha convertido en algo rutinario. Una técnica que puede utilizarse para la clonación de la región variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) y la región variable de la cadena ligera ( $V_L$ ) aparece descrita, por ej., en la publicación Orlandi *et al.*, PNAS, 1989; 86: 3833-3837. En realizaciones particulares, el dominio de unión específica a antígeno que es un scFv que une un polipéptido de cadena ligera  $\kappa$  o  $\lambda$ . En una determinada realización, el scFv se une a un receptor folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha_2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, o un polipéptido VEGFR2.

Un dominio de unión específica a antígeno humanizado ejemplar es una región variable de inmunoglobulina específica para un antígeno de tumor que comprende al menos una región marco humana. Una "región marco humana" se refiere a una región marco tipo salvaje (es decir, de origen natural) de una región variable de inmunoglobulina humana, una región marco modificada de una región variable de inmunoglobulina humana con menos de alrededor del 50% (por ej., preferentemente menos de alrededor del 45%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% o 1%) de los aminoácidos de la región se eliminan o sustituyen (por ej., con uno o más residuos de aminoácidos de una región marco de inmunoglobulina no humana en las posiciones correspondientes), o una región marco modificada de una región variable de inmunoglobulina no humana con menos de alrededor del 50% (por ej., menos del 45%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, o 5%) de los aminoácidos de la región se eliminan o sustituyen (por ej., en posiciones de residuos expuestos y/o con uno o más residuos de aminoácidos de una región marco de inmunoglobulina humana en las posiciones correspondientes) de modo que, en un aspecto, se reduce la inmunogenicidad.

En determinadas realizaciones, una región marco humana es una región marco tipo salvaje de una región variable de inmunoglobulina humana. En otras realizaciones determinadas, una región marco humana es una región marco modificada de una región variable de inmunoglobulina humana con eliminaciones o sustituciones de aminoácidos en una, dos, tres, cuatro o cinco posiciones. En otras realizaciones, una región marco humana es una región marco modificada de una región variable de inmunoglobulina no humana con eliminaciones o sustituciones de aminoácidos en una, dos, tres, cuatro o cinco posiciones.

En realizaciones particulares, un dominio de unión específica a antígeno comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho regiones marco (FR) humanas seleccionadas de la cadena ligera humana FR1, cadena pesada humana FR1, cadena ligera humana FR2, cadena pesada humana FR2, cadena ligera humana FR3, cadena pesada humana FR3, cadena ligera humana FR4, y cadena pesada humana FR4.

Las FRs humanas que pueden estar presentes en dominios de unión específica a antígeno también incluyen variantes de las FRs ejemplares proporcionadas en el presente documento en las que uno o dos aminoácidos de las FRs ejemplares se han sustituido o eliminado.

En determinadas realizaciones, un dominio de unión específica a antígeno humanizado comprende (a) una región variable humanizada de cadena ligera que comprende una cadena ligera humana FR1, una cadena ligera humana FR2, una cadena ligera humana FR3, y una cadena ligera humana FR4, y (b) una región variable humanizada de cadena pesada que comprende una cadena pesada humana FR1, una cadena pesada humana FR2, una cadena pesada humana FR3, y una cadena pesada humana FR4.

Los dominios de unión específica a antígeno comentados aquí también comprenden uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDRs. Dichas CDRs pueden ser CDRs no humanas o CDRs no humanas modificadas seleccionados de CDRL1, CDRL2 y CDRL3 de cadena ligera y de CDRH1, CDRH2 y CDRH3 de cadena pesada. En determinadas realizaciones, un dominio de unión específica a antígeno humanizado comprende (a) una región variable de cadena ligera que comprende una cadena ligera CDRL1, una cadena ligera CDRL2, una cadena ligera CDRL3, y (b) una región variable de cadena pesada que comprende una cadena pesada CDRH1, una cadena pesada CDRH2, y una cadena pesada CDRH3.

## 2. enlaces

En determinadas realizaciones, los CARs contemplados en el presente documento pueden comprender residuos de enlace entre los diversos dominios, por ej., entre los dominios  $V_H$  y  $V_L$ , añadidos para el espaciado y conformación adecuados de la molécula. Los CARs contemplados aquí pueden comprender uno, dos, tres, cuatro, o cinco o más enlaces. En realizaciones particulares, la longitud de un enlace es de alrededor de 1 a alrededor de 25 aminoácidos, de alrededor de 5 a alrededor de 20 aminoácidos, o de alrededor de 10 a alrededor de 20 aminoácidos, o cualquier longitud intermedia de

aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlace es de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o más aminoácidos de longitud.

5 Entre los ejemplos ilustrativos de enlaces figuran los polímeros de glicina ( $G_n$ ); los polímeros de glicina-serina ( $G_{1-5}S_{1-5}$ )<sub>n</sub>, en los que n es un número entero de al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco; polímeros de glicina-alanina; polímeros de alanina-serina; y otros enlaces flexibles conocidos en la técnica. Los polímeros de glicina y glicina-serina están relativamente desestructurados y, por lo tanto, pueden servir como un lazo neutro entre los dominios de proteínas de fusión como los CARs descritos aquí. La glicina permite un espacio phi-psi significativamente mayor que incluso la alanina, y está mucho menos restringida que los residuos con cadenas laterales más largas (ver Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173-142 (1992)). El experto en la materia reconocerá que el diseño de un CAR en realizaciones particulares puede incluir enlaces que son total o parcialmente flexibles, de modo que el enlace puede incluir un enlace flexible así como una o más porciones que confieren una estructura menos flexible para proporcionar una estructura CAR deseada.

15 Otros enlaces ejemplares son, entre otros, las siguientes secuencias de aminoácidos: GGG; DGGGS (ID SEC. N°: 4); TGEKP (ID SEC. N°: 5) (ver, *por ej.*, Liu *et al.*, PNAS 5525-5530 (1997)); GGRR (ID SEC. N°: 6) (Pomerantz *et al.* 1995, supra); (GGGGS)<sub>n</sub> donde n = 1, 2, 3, 4 o 5 (ID SEC. N°: 7) (Kim *et al.*, PNAS 93, 1156-1160 (1996.)); EGKSSGSGSESKVD (ID SEC. N°:8) (Chaudhary *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 87:1066-1070); KESGSVSSEQLAQFRSLD (ID SEC. N°:9) (Bird *et al.*, 1988, Science 242:423-426), GGRRGGGS (ID SEC. N°: 10); LRQRDGERP (ID SEC. N°:1 1); LRQKGGGSERP (ID SEC. N°: 12); LRQKd(GGGs)2 ERP (ID SEC. N°: 13). Alternativamente, los enlaces flexibles pueden diseñarse racionalmente usando un programa de ordenador capaz de modelar tanto los sitios de unión a ADN como los propios péptidos (Desjartais & Berg, PNAS 90:2256-2260 (1993), PNAS 91:11099-11103 (1994) o mediante métodos de visualización de fagos.

25 En realizaciones particulares, el CAR comprende un scFv que además comprende una secuencia de enlace de región variable. Una "secuencia de enlace de región variable" es una secuencia de aminoácidos que conecta una región variable de cadena pesada con una región variable de cadena ligera y proporciona una función de espaciador compatible con la interacción de los dos dominios de sub-unión, de modo que el polipéptido resultante mantiene una afinidad de unión específica con la misma molécula diana como un anticuerpo que comprende las mismas regiones variables de cadena ligera y pesada. En una realización, la secuencia de enlace de región variable es de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o más aminoácidos de longitud. En una realización particular, la secuencia de enlace de región variable comprende un polímero de glicina-serina ( $G_{1-5}S_{1-5}$ )<sub>n</sub>, donde n es un número entero de al menos 1, 2, 3, 4, o 5. En otra realización, la secuencia de enlace de región variable comprende un enlace de aminoácidos ( $G_4S$ )<sub>3</sub>.

### 35 **3. Dominio espaciador**

En realizaciones particulares, el dominio de unión del CAR va seguido de uno o más "dominios espaciadores", que se refieren a la región que aleja el dominio de unión a antígeno de la superficie de la célula efectora para permitir un contacto adecuado célula-célula, la unión a antígeno y la activación de este (Patel *et al.*, Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). El dominio bisagra puede derivar de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. En determinadas realizaciones, un dominio espaciador es una porción de una inmunoglobulina, que incluye, pero no se limita a, una o más regiones constantes de la cadena pesada, *por ej.*, CH2 y CH3. El dominio espaciador puede incluir la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de inmunoglobulina natural o una región bisagra de inmunoglobulina modificada.

45 En una realización, el dominio espaciador comprende las CH2 y CH3 de IgG1.

### **4. Dominio bisagra**

50 El dominio de unión del CAR va seguido de uno o más "dominios bisagra", que desempeñan la función de alejar el dominio de unión a antígeno de la superficie de la célula efectora para permitir un contacto adecuado de célula-célula, la unión a antígeno y la activación de este. Un CAR generalmente comprende uno o más dominios bisagra entre el dominio de unión y el dominio transmembrana (TM). El dominio bisagra puede derivar de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. El dominio bisagra puede incluir la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de inmunoglobulina natural o una región bisagra de inmunoglobulina modificada.

55 Una "región bisagra modificada" se refiere a: (a) una región bisagra natural con hasta un 30% de cambios de aminoácidos (*por ej.*, hasta un 25%, 20%, 15%, 10% o 5% de sustituciones o eliminaciones de aminoácidos), (b) una porción de una región bisagra natural que tiene al menos 10 aminoácidos (*por ej.*, al menos 12, 13, 14 o 15 aminoácidos) de longitud con hasta un 30 % de cambios de aminoácidos (*por ej.*, hasta un 25%, 20%, 15%, 10% o 5% de sustituciones o eliminaciones de aminoácidos), o (c) una porción de una región bisagra natural que comprende la región bisagra central (que puede tener 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, o al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos de longitud).

En determinados ejemplos, uno o más residuos de cisteína en una región bisagra de inmunoglobulina natural puede sustituirse por uno o más otros residuos de aminoácidos (*por ej.*, uno o más residuos de serina). Una región bisagra de inmunoglobulina modificada puede tener alternativamente o adicionalmente un residuo de prolina de una región bisagra de inmunoglobulina tipo salvaje sustituido por otro residuo de aminoácido (*por ej.*, un residuo de serina).

Otros dominios bisagra ilustrativos adecuados para el uso en los CARs descritos en el presente documento incluyen la región bisagra derivada de las regiones extracelulares de las proteínas de membrana de tipo 1 como CD8 $\alpha$ , CD4, CD28 y CD7, que pueden ser regiones bisagra tipo salvaje de estas moléculas o pueden estar modificadas. En las realizaciones, el dominio bisagra comprende una región bisagra de CD8 $\alpha$ .

### 5. Dominio transmembrana (TM)

El "dominio transmembrana" es la porción del CAR que fusiona la porción de unión extracelular y un dominio de señalización intracelular y ancla el CAR a la membrana plasmática de la célula efectora inmune. El dominio TM puede derivar de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. El dominio TM puede derivar de (*es decir*, comprender al menos la región(es) transmembrana de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de linfocitos T, CD3 épsilon, CD3 zeta, CD4, CD5, CD9, CD16, CD22, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, PD-1 y CD154. En un ejemplo particular, el dominio TM es sintético y comprende predominantemente residuos hidrofóbicos como la leucina y la valina.

En las realizaciones, los CARs contemplados en el presente documento comprenden un dominio TM derivado de CD8 $\alpha$ . En otra realización, un CAR contemplado en el presente documento comprende un dominio TM derivado de CD8 $\alpha$  y un enlace corto de oligopéptido o polipéptido, preferentemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos de longitud que enlaza el dominio TM y el dominio de señalización intracelular del CAR. Un enlace de glicina-serina proporciona un enlace particularmente adecuado.

### 6. Dominio de señalización intracelular

En ejemplos particulares, los CARs contemplados aquí comprenden un dominio de señalización intracelular. Un "dominio de señalización intracelular" se refiere a la parte de un CAR que participa en la transducción del mensaje de la unión eficaz del CAR a un antígeno diana en el interior de la célula efectora inmune para desencadenar la función de la célula efectora, *por ej.*, la activación, la producción de citoquinas, la proliferación y la actividad citotóxica, incluyendo la liberación de factores citotóxicos a la célula diana unida a CAR, u otras respuestas celulares desencadenadas con la unión de antígeno al dominio extracelular del CAR.

El término "función efectora" se refiere a una función especializada de la célula. La función efectora del linfocito T, *por ej.*, puede ser la actividad citolítica o la ayuda o la actividad que incluye la secreción de una citoquina. Así pues, el término "dominio de señalización intracelular" se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y que dirige a la célula para que realice una función especializada. Aunque normalmente se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario utilizar el dominio completo. En la medida en que se utilice una porción truncada de un dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada puede utilizarse en lugar del dominio completo siempre que transite la señal de la función efectora. El término "dominio de señalización intracelular" incluye cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular que sea suficiente para transducir la señal de la función efectora.

Se sabe que las señales generadas por el TCR por sí solas son insuficientes para la plena activación del linfocito T y que también se requiere una señal secundaria o coestimuladora. Así pues, puede decirse que la activación de los linfocitos T está mediada por dos clases distintas de dominios de señalización intracelulares: dominios de señalización primarios que inician la activación primaria dependiente del antígeno a través del TCR (*por ej.*, un complejo TCR/CD3) y dominios de señalización coestimuladores que actúan de forma independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora. En ejemplos preferentes, un CAR contemplado aquí comprende un dominio de señalización intracelular que comprende uno o más "dominio(s) de señalización coestimulador(es)" y un "dominio de señalización primario".

Los dominios de señalización primarios regulan la activación primaria del complejo TCR, ya sea de forma estimulante o de forma inhibitoria. Los dominios de señalización primarios que actúan de manera estimulante pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basados en inmunorreceptores de tirosina o ITAMs.

Entre los ejemplos ilustrativos de ITAM que contienen dominios de señalización primarios que son de particular utilidad se incluyen los derivados de TCR $\xi$ , FcR $\gamma$ , FcR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$ , CD22, CD79a, CD79b, y CD66d. En ejemplos preferentes en particular, un CAR comprende un dominio de señalización primario de CD3 $\xi$  y uno o más dominios de

señalización coestimuladores. Los dominios de señalización primarios y de señalización coestimuladores intracelulares pueden estar enlazados en cualquier orden en tándem con el terminal carboxilo del dominio transmembrana.

5 Los CARs contemplados en el presente documento comprenden uno o más dominios de señalización coestimuladores para mejorar la eficacia y la expansión de los linfocitos T que expresan los receptores CAR. Tal como se usan aquí, los términos "dominio de señalización coestimulador" o "dominio coestimulador" se refieren a un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de la superficie celular distintas de los receptores de antígeno o los receptores Fc que proporcionan una segunda señal necesaria para la activación y el funcionamiento eficiente de los linfocitos T al unirse al antígeno. Algunos ejemplos ilustrativos de dichas moléculas coestimuladoras son CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, PD-1, ICOS (CD278), CTLA4, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, y NKD2C, y CD83. En un ejemplo, un CAR comprende uno o más dominios de señalización coestimuladores seleccionados del grupo formado por CD28, CD137 y CD134, y un dominio de señalización primario de CD3ξ.

15 En otra realización, un CAR comprende dominios de señalización coestimuladores de CD28 y CD137 y un dominio de señalización primario de CD3ξ.

En otro ejemplo más, un CAR comprende dominios de señalización coestimuladores de CD28 y CD134 y un dominio de señalización primario de CD3ξ.

20 En una realización, un CAR comprende dominios de señalización coestimuladores de CD137 y CD134 y un dominio de señalización primario de CD3ξ.

En una realización, un CAR comprende un dominio de señalización coestimulador de CD137 y un dominio de señalización primario de CD3ξ.

25 En un ejemplo, un CAR comprende un dominio de señalización coestimulador de CD134 y un dominio de señalización primario de CD3ξ.

30 En un ejemplo, un CAR comprende un dominio de señalización coestimulador de CD28 y un dominio de señalización primario de CD3ξ.

En ejemplos particulares, los CARs contemplados en el presente documento comprenden un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno que se une específicamente a un receptor folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CALX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha_2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, o un polipéptido VEGFR2 expresado en una célula tumoral.

35 En un ejemplo, un CAR comprende un scFv que se une a un receptor de folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha_2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, o un polipéptido VEGFR2; un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo formado por: CD8 $\alpha$ ; CD4, CD45, PD1 y CD152; y uno o más dominios de señalización coestimuladores intracelulares seleccionados del grupo formado por: CD28, CD54, CD134, CD137, CD152, CD273, CD274, y CD278; y un dominio de señalización primario de CD3ξ.

45 En otro ejemplo, un CAR comprende un scFv que se une a un receptor de folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha_2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, o un polipéptido VEGFR2; un dominio bisagra seleccionado del grupo formado por: bisagra de IgG1/CH2/CH3 y CD8 $\alpha$ , y CD8 $\alpha$ ;

un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo formado por: CD8 $\alpha$ ; CD4, CD45, PD1 y CD152; y uno o más dominios de señalización coestimuladores intracelulares seleccionados del grupo formado por: CD28, CD134 y CD137; y un dominio de señalización primario de CD $\xi$ .

5 En otro ejemplo más, un CAR comprende un scFv, que comprende además un enlace, que se une a un receptor de folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha_2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, o un polipéptido VEGFR2; un dominio bisagra seleccionado del grupo formado por: bisagra de IgG1/CH2/CH3 y CD8 $\alpha$ , y CD8 $\alpha$ ; un dominio transmembrana que comprende un dominio TM derivado de un polipéptido seleccionado del grupo formado por: CD8 $\alpha$ ; CD4, CD45, PD1 y CD152, y un enlace corto de oligopéptido o polipéptido, preferentemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos de longitud que conecta el dominio TM con el dominio de señalización intracelular del CAR; y uno o más dominios de señalización coestimuladores intracelulares seleccionados del grupo formado por CD28, CD134 y CD137; y un dominio de señalización primario de CD3 $\xi$ .

En un ejemplo particular, un CAR comprende un scFv que une un receptor folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CALX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-I, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha_2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, o un polipéptido VEGFR2; un dominio bisagra que comprende un polipéptido bisagra PD1 o CD152; un dominio transmembrana PD1 o CD152 que comprende un polipéptido enlace de alrededor de 3 aminoácidos; un dominio de señalización coestimulador intracelular CD137; y un dominio de señalización primario CD3 $\xi$ .

En un ejemplo particular, un CAR comprende un scFv que une un receptor folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CALX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-I, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha_2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, o un polipéptido VEGFR2; un dominio bisagra que comprende un polipéptido bisagra PD1 o CD152; un dominio transmembrana PD1 o CD152 que comprende un polipéptido enlace de unos de 3 aminoácidos; un dominio de señalización coestimulador intracelular CD134; y un dominio de señalización primario CD3 $\xi$ .

En un ejemplo particular, un CAR comprende un scFv que une un receptor folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CALX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha_2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, o un polipéptido VEGFR2; un dominio bisagra que comprende un polipéptido bisagra PD1 o CD152; un dominio transmembrana PD1 o CD152 que comprende un polipéptido enlace de unos 3 aminoácidos; un dominio de señalización coestimulador intracelular CD28; y un dominio de señalización primario CD3 $\xi$ .

En un ejemplo particular, un CAR comprende un scFv que une un receptor folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CALX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha_2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, o un polipéptido VEGFR2; un dominio bisagra que comprende un polipéptido bisagra de IgG1/CH2/CH3 y un polipéptido de CD8 $\alpha$ ; un dominio transmembrana de CD8 $\alpha$  que comprende un enlace de polipéptido de alrededor de 3 aminoácidos; un dominio de señalización coestimulador intracelular de CD137; y un dominio de señalización primario de CD3 $\xi$ .

En un ejemplo particular, un CAR comprende un scFv que une un receptor folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CALX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138,

5 CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 2, Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, o un polipéptido VEGFR2; un dominio bisagra que comprende un polipéptido CD8 $\alpha$ ; un dominio transmembrana de CD8 $\alpha$  que comprende un enlace de polipéptido de unos 3 aminoácidos; un dominio de señalización coestimulador intracelular de CD134; y un dominio de señalización primario de CD3 $\xi$ .

10 En un ejemplo particular, un CAR comprende un scFv que une un receptor folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha$ v $\beta$ 6, BCMA, B7-H3, B7-H6, CALX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 2, Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, o un polipéptido VEGFR2; un dominio bisagra que comprende un polipéptido CD8 $\alpha$ ; un dominio transmembrana de CD8 $\alpha$  o CD152 que comprende un enlace de polipéptido de unos 3 aminoácidos; un dominio de señalización coestimulador intracelular de CD134; y un dominio de señalización primario de CD3 $\xi$ .

20 Además, el diseño de los vectores contemplados en el presente documento permite mejorar la expansión, la persistencia a largo plazo y las propiedades citotóxicas de los linfocitos T y la expresión persistente de los CARs a lo largo de la vida de las células, en comparación con los linfocitos T no modificados o linfocitos T modificados con otros vectores.

#### D. Polipéptidos

25 La presente revelación contempla, en parte, los polipéptidos de CAR y fragmentos de estos, células y composiciones que los componen y vectores que expresan polipéptidos. En los ejemplos preferentes, se proporciona un polipéptido que comprende uno o más CAR codificados por una secuencia de polinucleótidos como se establece en las ID SEC. N $^{\circ}$ : 2 y 3.

30 "Polipéptido", "fragmento de polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente, salvo que se especifique lo contrario, y de acuerdo con el significado convencional, *es decir*, como una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos no se limitan a una longitud específica, *por ej.*, pueden comprender una secuencia de proteínas de longitud completa o un fragmento de una proteína de longitud completa, y pueden incluir modificaciones post-traduccionales del polipéptido, por ej., glucosilación, acetilación, fosforilación y similares, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como no natural. En varios ejemplos, los polipéptidos de CAR contemplados en el presente documento comprenden una secuencia señal (o líder) en el extremo amino de la proteína, que dirige cotraduccional o postraduccionalmente el transporte de la proteína. Entre los ejemplos ilustrativos de secuencias señal adecuadas (péptidos señal) útiles en los CARs relevados aquí figuran, entre otros, el polipéptido señal de cadena pesada de IgG1, un polipéptido señal CD8 $\alpha$  o un péptido señal alfa de un receptor de GM-CSF humano. Los polipéptidos pueden prepararse utilizando cualquiera de las diversas técnicas recombinantes y/o sintéticas conocidas en la técnica. Los polipéptidos contemplados aquí abarcan específicamente los CARs del presente documento, o secuencias que tienen eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de un CAR como se revela aquí.

45 Un "péptido aislado" o un "polipéptido aislado" y similares, tal como se utilizan aquí, se refieren al aislamiento y/o purificación *in vitro* de una molécula de péptido o polipéptido de un entorno celular, y de la asociación con otros componentes de la célula, *es decir*, no se asocia significativamente con sustancias *in vivo*. Asimismo, una "célula aislada" se refiere a una célula que se ha obtenido de un tejido u órgano *in vivo* y está sustancialmente fuera de la matriz extracelular.

50 En polipéptidos se incluyen "variantes de polipéptido". Las variantes de polipéptido pueden diferir de un polipéptido natural en una o más sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones. Dichas variantes pueden ser naturales o pueden generarse sintéticamente, por ej., modificando una o más de las secuencias de polipéptidos mencionadas anteriormente. Por ejemplo, en ejemplos particulares, puede ser conveniente mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de los CARs introduciendo una o más sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones en un dominio de unión, bisagra, dominio TM, dominio de señalización coestimulador o dominio de señalización primario de un polipéptido de CAR. Preferentemente, entre los polipéptidos de la revelación se incluyen polipéptidos que tienen al menos alrededor de un 65 %, 70 %, 75 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 % de identidad de aminoácidos en ellos.

60 En polipéptidos se incluyen "fragmentos de polipéptido". Los fragmentos de polipéptido se refieren a un polipéptido, que puede ser monomérico o multimérico, que tiene una supresión amino-terminal, una supresión carboxil-terminal, y/o una supresión o sustitución interna de un polipéptido natural o producido recombinantemente. En determinados ejemplos, un

fragmento de polipéptido puede comprender una cadena de aminoácidos de al menos 5 a alrededor de 500 aminoácidos de longitud. Se apreciará que en determinados ejemplos, los fragmentos son al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400, o 450 aminoácidos largos. Entre los fragmentos de polipéptido especialmente útiles se encuentran los dominios funcionales, incluyendo los dominios de unión a antígeno o los fragmentos de anticuerpos. En el caso de un anticuerpo anti-kappa o anti-lambda de cadena ligera, los fragmentos útiles son, entre otros: una región CDR, una región CDR3 de la cadena pesada o cadena ligera; una región variable de una cadena pesada o cadena ligera; una porción de una cadena de anticuerpos o una región variable que incluye dos CDRs; y similares.

El polipéptido también puede fusionarse en marco o conjugarse con un enlace u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido (*por ej.*, Poli-His), o para mejorar la unión del polipéptido a un soporte sólido.

Como se ha señalado anteriormente, los polipéptidos de la revelación pueden modificarse de diversas maneras, entre ellas, sustituciones, supresiones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. Los métodos para dichas manipulaciones son generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, las variantes de secuencia de aminoácidos de un polipéptido de referencia pueden prepararse mediante mutaciones en el ADN. Son bien conocidos en la técnica los métodos para la mutagénesis y las modificaciones de secuencias de nucleótidos. ver, *por ej.*, Kunkel (1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 82: 488-492), Kunkel *et al.*, (1987, *Methods in Enzymol.* 154: 367-382), pat. USA N° 4.873.192, Watson, J. D. *et al.*, (*Molecular Biology of the Gene*, 4ª edición, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif, 1987) y las referencias citadas en esta publicación. Puede encontrarse orientación sobre las sustituciones apropiadas de aminoácidos que no afectan a la actividad biológica de la proteína de interés en el modelo de Dayhoff *et al.*, (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.).

En determinados ejemplos, una variante contendrá sustituciones conservadoras. Una "sustitución conservadora" es aquella en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de manera que un experto en la química de los péptidos esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido se mantuvieran sin cambios sustanciales. Se pueden hacer modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente revelación y aun así obtener una molécula funcional que codifique un polipéptido variante o derivado con características deseables. Cuando se desea modificar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido para crear un polipéptido equivalente, o incluso una variante mejorada del polipéptido de presente revelación, un experto en la materia, *por ej.*, puede cambiar uno o más de los codones de la secuencia de ADN codificante, *por ej.*, según la tabla 1.

**TABLA 1 - Codones de aminoácidos**

Aminoácidos	Código de una letra	Código de tres letras	Codones					
Alanina	A	Ala	GCA	GCC	GCG	GCU		
Cisteína	C	Cys	UGC	UGU				
Ácido aspártico	D	Asp	GAC	GAU				
Ácido glutámico	E	Glu	GAA	GAG				
Fenilalanina	F	Phe	UUC	UUU				
Glicina	G	Gly	GGA	GGC	GGG	GGU		
Histidina	H	His	CAC	CAU				
Isoleucina	I	Iso	AUA	AUC	AUU			
Lisina	K	Lys	AAA	AAG				
Leucina	L	Leu	UUA	UUG	CUA	cue	CUG	CUU
Metionina	M	Met	AUG					
Asparagina	N	Asn	AAC	AAU				

Prolina	P	Pro	CCA	CCC	CCG	ecu		
Glutamina	Q	Gin	CAA	CAG				
Arginina	R	Arg	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Serina	S	Ser	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Treonina	T	Thr	ACA	ACC	ACG	ACU		
Valina	V	Val	GUA	GUC	GUG	GUU		
Triptófano	w	Trp	UGG					
Tirosina	Y	Tyr	UAC	UAU				

La orientación para determinar qué residuos de aminoácidos pueden sustituirse, insertarse o eliminarse sin suprimir la actividad biológica se puede encontrar usando programas informáticos bien conocidos en la técnica, como el software DNASTAR™. Preferentemente, los cambios de aminoácidos en las variantes de proteína reveladas aquí son cambios conservadores de aminoácidos, *es decir*, sustituciones de aminoácidos con carga o sin carga de forma similar. Un cambio conservador de aminoácidos implica la sustitución de uno de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales.

Los aminoácidos naturales se dividen generalmente en cuatro familias: ácidos (aspartato, glutamato), básicos (lisina, arginina, histidina), apolares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), y polares sin carga (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos. En un péptido o proteína, las sustituciones conservadoras adecuadas de aminoácidos son conocidas por los expertos en la materia y generalmente pueden realizarse sin alterar la actividad biológica de una molécula resultante. Los expertos reconocen que, en general, las sustituciones de un solo aminoácido en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (ver, *por ej.*, Watson *et al. Molecular Biology of the Gene*, 4.<sup>a</sup> edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., pág. 224). Las sustituciones conservadoras ejemplares se describen en la solicitud de patente provisional USA N° 61/241.647.

Al hacer dichos cambios, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir una función biológica interactiva a una proteína es generalmente conocida en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982). A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basándose en sus características de hidrofobicidad y de carga (Kyte y Doolittle, 1982). Estos valores son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cisteína (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Es conocido por los expertos en la materia que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tengan un índice o puntuación hidropática similar y aún así dar lugar a una proteína con una actividad biológica similar, *es decir*, aun así obtener una proteína biológica funcionalmente equivalente. Al hacer dichos cambios, la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de  $\pm 2$  es preferida, aquellos dentro de  $\pm 1$  son particularmente preferidos, y aquellos dentro de  $\pm 0,5$  son aún más particularmente preferidos. También se comprende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede hacerse eficazmente sobre la base de hidrofobicidad.

Como se detalla en la patente USA N° 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofobicidad a residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0  $\pm$  1); glutamato (+3,0  $\pm$  1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,0  $\pm$  1,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5  $\pm$  1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido puede sustituirse por otro de valor de hidrofobicidad similar y aun así obtener una proteína equivalente biológicamente y, en particular, inmunológicamente equivalente. En dichos cambios, la sustitución de aminoácidos cuyos valores hidropáticos están dentro de  $\pm 2$  es preferida, aquellos dentro de  $\pm 1$  son particularmente preferentes, y aquellos dentro de  $\pm 0,5$  son aún más particularmente preferentes. Como se ha señalado anteriormente, las sustituciones de aminoácidos pueden basarse en la similitud relativa de los sustitutivos de cadena lateral de aminoácidos, por ej., su hidrofobicidad, hidrofobicidad, carga, tamaño y similares.

Las variantes de polipéptidos incluyen además formas glicosiladas, conjugados agregados con otras moléculas y conjugados covalentes con grupos químicos no relacionados (*por ej.*, moléculas pegiladas). Las variantes covalentes pueden prepararse enlazando funcionalidades a grupos que se encuentran en la cadena de aminoácidos o en el residuo

de extremo N o C, como se conoce en la técnica. Las variantes también incluyen variantes alélicas, variantes de especies, y mutaciones. También son variantes los truncamientos o supresiones de regiones que no afectan a la actividad funcional de las proteínas.

- 5 En un ejemplo, donde se desea la expresión de dos o más polipéptidos, las secuencias de polinucleótidos que los codifican pueden separarse por una secuencia IRES, como se menciona en otra parte del presente documento. En otro ejemplo, dos o más polipéptidos pueden expresarse como una proteína de fusión que comprende una o más secuencias de polipéptidos autoescindibles.
- 10 Los polipéptidos de la presente revelación incluyen los polipéptidos de fusión. En ejemplos preferidos, se proporcionan polipéptidos y polinucleótidos de fusión que codifican polipéptidos de fusión, *por ej.*, los CARs. Los polipéptidos de fusión y las proteínas de fusión se refieren a un polipéptido que tiene al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez o más segmentos de polipéptido. Los polipéptidos de fusión están típicamente enlazados de un extremo C a un extremo N, aunque también pueden estar enlazados de un extremo C a un extremo C, de un extremo N a un extremo N, o de un extremo N a un extremo C. Los polipéptidos de la proteína de fusión pueden estar en cualquier orden o en un orden específico. Los polipéptidos de fusión o las proteínas de fusión también pueden incluir variantes modificadas conservadoramente, variantes polimórficas, alelos, mutantes, sub-secuencias y homólogos entre especies, siempre que se preserve la actividad transcripcional deseada del polipéptido de fusión. Los polipéptidos de fusión pueden producirse por métodos de síntesis química o por enlace químico entre los dos grupos o, en general, pueden prepararse utilizando otras técnicas estándar.

Las secuencias de ADN ligadas que comprenden el polipéptido de fusión están enlazadas operativamente a elementos de control transcripcional o traslacional adecuados, como se menciona en otra parte del presente documento.

- 25 En un ejemplo, un compañero de fusión comprende una secuencia que ayuda a expresar la proteína (un potenciador de la expresión) a rendimientos más altos que la proteína recombinante nativa. Se pueden seleccionar otros elementos de fusión para aumentar la solubilidad de la proteína o para permitir que la proteína se dirija a compartimentos intracelulares deseados o para facilitar el transporte de la proteína de fusión a través de la membrana celular.
- 30 Los polipéptidos de fusión pueden comprender además una señal de escisión de polipéptido entre cada uno de los dominios de polipéptido descritos aquí. Además, un sitio de polipéptido puede ponerse en cualquier secuencia de péptidos enlazados. Entre las señales de escisión de polipéptidos ejemplares figuran los sitios de reconocimiento de escisión de polipéptidos, como los sitios de escisión de proteasa, los sitios de escisión de nucleasa (*por ej.*, sitios de reconocimiento de enzimas de restricción poco comunes, sitios de reconocimiento de ribocimas autoescindibles) y oligopéptidos virales autoescindibles (ver de Felipe y Ryan, 2004. *Traffic*, 5(8); 616-26).

Son conocidos por el experto en la materia los sitios de escisión de la proteasa y los péptidos autoescindibles adecuados (ver, *por ej.*, en Ryan *et al.*, 1997. *J. Gener. Virol.* 78, 699-722; Scymczak *et al.* (2004) *Nature Biotech.* 5, 589-594). Entre los sitios de escisión de proteasa se incluyen, entre otros, los sitios de escisión de proteasas NIa de potivirus (*por ej.*, la proteasa del virus del tabaco), proteasas HC de potivirus, proteasas PI de potivirus (P35), proteasas NIa de biovirus, proteasas de biovirus codificadas con ARN-2, proteasas L de aftovirus, las proteasas 2A de enterovirus, proteasas 2A de rinovirus, proteasas 3C de picornavirus, proteasas 24K de comovirus, proteasas 24K de nepovirus, RTSV (virus esférico del tungro del arroz), PYVF (virus de la mancha amarilla de la chirivía), heparina, trombina, factor Xa y enterocinasa. Debido a su gran restricción de escisión, se prefieren los sitios de escisión de proteasa TEV (virus del tabaco) en un ejemplo, *por ej.*, EXXYXQ(G/S) (ID SEC. N°: 14), *por ej.*, ENLYFQG (ID SEC. N°: 15) y ENLYFQS (ID SEC. N°: 16), donde X representa cualquier aminoácido (la escisión por TEV se produce entre Q y G o Q y S).

En un ejemplo en particular, los péptidos autoescindibles incluyen las secuencias de polipéptido obtenidas de los péptidos 2A de potivirus y cardiovirus, FMDV (virus de la fiebre aftosa), virus de la rinitis equina A, virus de *Thosea asigna*, y teschovirus porcino.

En determinados ejemplos, el sitio de polipéptido autoescindible comprende un sitio, secuencia o dominio de tipo 2A o 2A (Donnelly *et al.*, 2001. *J. Gen. Virol.* 82:1027-1041).

55 **TABLA 2: Los sitios ejemplares 2A incluyen las siguientes secuencias:**

ID SEC. N°: 17	LLNFDLLKL AGD VE SNP GP
ID SEC. N°: 18	TLNFDLLKL AGD VE SNP GP

ID SEC. Nº: 19	LLKLAGDVE SNP GP
ID SEC. Nº: 20	NFDLLKL AGD VE SNP GP
ID SEC. Nº: 21	QLLNFDLLKL AGD VE SNP GP
ID SEC. Nº: 22	AP VKQTLNFDLLKL AGD VE SNP GP
ID SEC. Nº: 23	VELLYRMKRAETYCPRLAIHPTEARHKQKIVAPVKQT
ID SEC. Nº: 24	LNFDLLKL AGD VE SNP GP
ID SEC. Nº: 25	LLAIHPTEARHKQKTVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
ID SEC. Nº: 26	E ARHKQKIV AP VKQTLNFDLLKL AGD VE SNP GP

En ejemplos preferentes, un polipéptido contemplado en el presente documento comprende un polipéptido de CAR.

### E. Polinucleótidos

5

En realizaciones particulares, se proporcionan polinucleótidos que comprenden un promotor MND y un polinucleótido que codifica uno o más CARs. En realizaciones preferidas, un polinucleótido comprende un promotor MND enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica uno o más CARs como se establece en las ID SEC. Nº: 2 y 3. Tal como se utilizan aquí, los términos "polinucleótido" o "ácido nucleico" se refieren al ARN mensajero (ARNm), ARN, ARN genómico (ARNg), hebra + de ARN (ARN(+)), hebra - de ARN (ARN(-)), ADN genómico (ADNg), ADN complementario (ADNc) o ADN recombinante. En polinucleótidos también se incluyen polinucleótidos monocatenarios y bicatenarios. Preferentemente, en los polinucleótidos de la presente invención se incluyen polinucleótidos o variantes que tengan al menos una identidad de secuencia de alrededor del 50 %, 55 %, 60%, 65 %, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% a cualquiera de las secuencias de referencia descritas en el presente documento (ver, *por ej.*, Lista de secuencias), típicamente cuando la variante mantiene al menos una actividad biológica de la secuencia de referencia. En varios ejemplos ilustrativos, la presente revelación contempla, en parte, polinucleótidos que comprenden vectores de expresión, vectores virales y plásmidos de transferencia, y composiciones y células que los comprenden.

10

15

20

25

30

En ejemplos particulares, se proporcionan polinucleótidos mediante esta revelación que codifican al menos alrededor de 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 1000, 1250, 1500, 1750, o 2000 o más residuos de aminoácidos contiguos de un polipéptido de la presente revelación, así como todas las longitudes intermedias. Se entenderá fácilmente que "longitudes intermedias", en este contexto, significa cualquier longitud entre los valores citados, como 6, 7, 8, 9, *etc.*, 101, 102, 103, *etc.*; 151, 152, 153, *etc.*; 201, 202, 203, *etc.* Tal como se utilizan aquí, los términos "variante de polinucleótido" y "variante" y similares se refieren a polinucleótidos que muestran una identidad de secuencia sustancial con una secuencia de polinucleótido de referencia o polinucleótidos que se hibridan con una secuencia de referencia en condiciones rigurosas que se definen más adelante. Estos términos abarcan polinucleótidos en los que se han añadido o suprimido uno o más nucleótidos, o se han sustituido por nucleótidos diferentes en comparación con un polinucleótido de referencia. A este respecto, es bien conocido por los expertos en la materia que pueden hacerse determinadas modificaciones, incluyendo mutaciones, adiciones, supresiones y sustituciones a un polinucleótido de referencia, mediante las cuales el polinucleótido modificado conserva la función o actividad biológica del polinucleótido de referencia.

35

40

45

Las expresiones "identidad de secuencia" o, *por ej.*, que comprenden una "secuencia 50% idéntica a", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a la medida en que las secuencias son idénticas en una base de nucleótido por nucleótido o de aminoácido por aminoácido en una ventana de comparación. Así pues, se puede calcular un "porcentaje de identidad de secuencia" comparando dos secuencias alineadas óptimamente en la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que se produce la base de ácido nucleico idéntica (*por ej.*, A, T, C, G, I) o el residuo de aminoácido idéntico (*por ej.*, A, T, C, G, I), Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, He, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gin, Cys y Met) en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (*es decir*, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de la secuencia. Se incluyen los nucleótidos y polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos alrededor del 50%, 55 %, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% a cualquiera de las secuencias de referencia descritas en el presente documento, típicamente cuando la variante de polipéptido mantiene al menos una actividad biológica de la secuencia de referencia.

Entre los términos utilizados para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos se incluyen "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de

secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" tiene una longitud de al menos 12, pero con frecuencia de 15 a 18 y a menudo al menos de 25 unidades monoméricas, incluyendo los nucleótidos y residuos de aminoácidos. Dado que dos polinucleótidos pueden comprender cada uno de ellos (1) una secuencia (*es decir*, solo una porción de la secuencia de polinucleótido completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos se realizan típicamente comparando secuencias de los dos polinucleótidos en una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencias. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, normalmente de alrededor de 50 a alrededor de 100, más normalmente de alrededor de 100 a alrededor de 150, en el que una secuencia se compara con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén óptimamente alineadas. La ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (*es decir*, huecos) de alrededor del 20% o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para una alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de las secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse mediante implementaciones computerizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Release, versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, EE.UU.) o mediante la inspección y la mejor alineación (*es decir*, resultante en el mayor porcentaje de homología en la ventana de comparación) generada por cualquiera de los diversos métodos seleccionados. También se puede hacer referencia a la familia de programas BLAST como por ej. el revelado por Altschul *et al.*, 1997, Nucl. Acids Res. 25:3389. Se puede encontrar un análisis detallado del análisis de secuencias en la Unidad 19.3 de Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, capítulo 15. Tal como se utiliza aquí, "polinucleótido aislado" se refiere a un polinucleótido que ha sido purificado de las secuencias que lo flanquean en un estado natural, *por ej.*, un fragmento de ADN que se ha eliminado de las secuencias que normalmente están adyacentes al fragmento. Un "polinucleótido aislado" también se refiere a un ADN complementario (ADNc), un ADN recombinante u otro polinucleótido que no existe en la naturaleza y que ha sido fabricado por un humano.

Entre los términos que describen la orientación de los polinucleótidos se incluyen: 5' (normalmente el extremo del polinucleótido que tiene un grupo de fosfato libre) y 3' (normalmente el extremo del polinucleótido que tiene un grupo de hidroxilo (OH) libre). Las > secuencias de polinucleótidos pueden anotarse en la orientación de 5' a 3' o en la de 3' a 5'. En el caso del ADN y el ARNm, la hebra de 5' a 3' se designa como la hebra "sentido", "positiva" o "codificante" porque su secuencia es idéntica a la del mensajero (pre-ARNm) [excepto por el uracilo (U) en el ARN, en lugar de la timina (T) en el ADN]. En el caso del ADN y el ARNm, la hebra complementaria de 3' a 5' que es la hebra transcrita por el ARN polimerasa se designa como hebra "plantilla", "antisentido", "negativa" o "no codificante". Tal como se utiliza aquí, el término "orientación inversa" se refiere a una secuencia de 5' a 3' escrita en la orientación de 3' a 5' o una secuencia de 3' a 5' escrita en la orientación de 5' a 3'. Los términos "complementario" y "complementariedad" se refieren a los polinucleótidos (*es decir*, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las reglas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, la hebra complementaria de la secuencia de ADN 5' A G T C A T G 3' es 3' T C A G T A C 5'. Esta última secuencia se escribe a menudo como el complemento inverso con el extremo 5' a la izquierda y el extremo 3' a la derecha, 5'CATGACT3'. Se dice que una secuencia que es igual a su complemento inverso es una secuencia palindrómica. La complementariedad puede ser "parcial", en la que solo algunas de las bases de los ácidos nucleicos se emparejan de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases. O bien, puede haber una complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos.

Además, será apreciado por los expertos en la materia que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido, o fragmento de variante de este, como se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos tienen una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, en la presente invención se contemplan específicamente los polinucleótidos que varían debido a las diferencias en el uso del codón, por ej., los polinucleótidos que están optimizados para la selección del codón de los humanos y/o primates. Además, también pueden utilizarse los alelos de los genes que componen las secuencias de polinucleótidos que se proporcionan aquí. Los alelos son genes endógenos que se alteran como resultado de una o más mutaciones, tales como supresiones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos.

El término "casete de ácido nucleico", tal como se utiliza aquí, se refiere a las secuencias genéticas dentro de un vector que puede expresar un ARN y, posteriormente, una proteína. El casete de ácido nucleico contiene un promotor y un gen de interés, *por ej.*, un CAR. El casete de ácido nucleico está orientado posicional y secuencialmente dentro del vector, de modo que el ácido nucleico del casete puede transcribirse en ARN y, cuando sea necesario, traducirse en una proteína o un polipéptido, someterse a las modificaciones postraduccionales apropiadas necesarias para la actividad en la célula transformada y translocarse al compartimento apropiado para la actividad biológica, dirigiéndose a los compartimentos intracelulares apropiados o a la secreción en los compartimentos extracelulares. Preferentemente, el casete tiene sus extremos 3' y 5' adaptados para su fácil inserción en un vector, *por ej.*, tiene sitios de endonucleasas de restricción en cada extremo. En una realización preferente de la invención, el casete de ácido nucleico contiene la secuencia de un promotor MND y un receptor de antígeno químico contemplado aquí. El casete puede extraerse e insertarse en un plásmido o vector viral como una sola unidad.

En ejemplos particulares, los polinucleótidos incluyen al menos un polinucleótido de interés. Tal como se utiliza aquí, el término "polinucleótido de interés" se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido (es decir, un polipéptido de interés), insertado en un vector de expresión que se desea expresar. Un vector puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 polinucleótidos de interés. En determinados ejemplos, el polinucleótido de interés codifica un polipéptido que tiene un efecto terapéutico en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno. Los polinucleótidos de interés, y los polipéptidos codificados a partir de ellos, abarcan tanto polinucleótidos que codifican polipéptidos tipo salvaje, como variantes y fragmentos funcionales de estos. En ejemplos en particular, una variante funcional tiene una identidad de al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99% con los ejemplos correspondientes a una secuencia de polipéptido o polinucleótido de referencia tipo salvaje. En determinadas realizaciones, una variante o fragmento funcional tiene al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o al menos el 90% de una actividad biológica de un polipéptido tipo salvaje correspondiente.

En un ejemplo, el polinucleótido de interés no codifica un polipéptido, sino que sirve como plantilla para transcribir miARN, siARN, o ARNhc, ribozima u otro ARN inhibidor. En diversas realizaciones, un polinucleótido comprende un polinucleótido de interés que codifica un CAR y uno o más polinucleótidos de interés adicionales que incluyen, entre otros, una secuencia de ácido nucleico inhibidor que incluye, entre otros, un siARN, un miARN, un ARNhc y una ribozima.

Tal como se utilizan aquí, los términos "siARN" o "ARN de interferencia corto" se refieren a una secuencia corta de polinucleótidos que median un proceso de silenciamiento génico post-transcripcional específico de secuencia, inhibición traslacional, inhibición transcripcional o ARNi epigenético en animales (Zamore *et al.*, 2000, *Cell*, 101, 25-33; Fire *et al.*, 1998, *Nature*, 391, 806; Hamilton *et al.*, 1999, *Science*, 286, 950-951; Lin *et al.*, 1999, *Nature*, 402, 128-129; Sharp, 1999, *Genes & Dev.*, 13, 139-141; y Strauss, 1999, *Science*, 286, 886). En determinadas realizaciones, un siARN comprende una primera y una segunda hebra que tienen el mismo número de nucleósidos; sin embargo, la primera y la segunda hebra están compensadas de tal manera que los dos nucleósidos terminales de la primera y la segunda hebra no se emparejan con un residuo de la hebra complementaria. En ciertos casos, los dos nucleósidos que no están emparejados son residuos de timidina. El ARNpi debe incluir una región de suficiente homología con el gen diana y tener una longitud suficiente en términos de nucleótidos, de modo que el ARNpi, o un fragmento de este, pueda mediar la regulación del gen diana. Así pues, un siARN incluye una región que es al menos parcialmente complementaria del ARN diana. No es necesario que exista una perfecta complementariedad entre el ARNpi y la diana, pero la correspondencia debe ser suficiente para permitir que el ARNpi, o un producto de la escisión del mismo, dirija el silenciamiento específico de la secuencia, como por la escisión de ARNi del ARN diana. La complementariedad, o grado de homología con la hebra diana, es más crítica en la hebra antisentido. Si bien a menudo se desea una perfecta complementariedad, en particular en la hebra antisentido, algunas realizaciones incluyen uno o más, pero preferentemente 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, o menos errores de emparejamiento con respecto al ARN diana. Los errores de emparejamiento son más tolerados en las regiones terminales, y si están presentes, son preferentemente en una región o regiones terminales, *por ej.*, dentro de 6, 5, 4 o 3 nucleótidos del extremo 5' y/o 3'. La hebra con sentido solo tiene que ser lo suficientemente complementaria con la hebra antisentido para mantener el carácter bicatenario general de la molécula.

Además, un ARNpi puede modificarse o incluir análogos de nucleósidos. Las regiones monocatenarias de un siARN pueden modificarse o incluir análogos de nucleósidos, *por ej.*, la región o regiones no emparejadas de una estructura de horquilla, *por ej.*, una región que une dos regiones complementarias, pueden tener modificaciones o análogos de nucleósidos. También son útiles las modificaciones para estabilizar uno o más extremos 3' o 5' de un ARNpi, *por ej.*, contra lexonucleasas, o para favorecer que el agente de ARNpi antisentido entre en el RISC. Entre las modificaciones se pueden incluir los enlaces de amino C3 (o C6, C7, C12), enlaces tiol, enlaces de carboxilo, espaciadores no nucleotídicos (C3, C6, C9, C12, abásico, trietilenglicol, hexaetilenglicol), reactivos de biotina o fluoresceína especiales que vienen en forma de fosforamiditas y que tienen otro grupo hidroxilo protegido con DMT, lo que permite múltiples acoplamientos durante la síntesis de ARN. Cada hebra de un ARNpi puede tener una longitud igual o inferior a 30, 25, 24, 23, 22, 21 o 20 nucleótidos. La hebra tiene preferentemente una longitud de al menos 19 nucleótidos. Por ejemplo, cada hebra puede tener entre 21 y 25 nucleótidos de longitud. Los ARNpi preferidos tienen una región dúplex de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 pares de nucleótidos, y uno o más salientes de 2-3 nucleótidos, preferentemente uno o dos salientes de 3' de 2-3 nucleótidos.

Tal como se utilizan aquí, los términos "miARN" o "microARN" se refieren a pequeños ARN no codificantes de 20 a 22 nucleótidos, que se extraen típicamente de las estructuras precursoras de ARN plegado de -70 nucleótidos conocidas como pre-miARN. Los miARN regulan negativamente sus dianas de una de dos maneras, dependiendo del grado de complementariedad entre el miARN y la diana. Primero, los miARN que se unen con perfecta o casi perfecta complementariedad a las secuencias de ARNm codificadoras de proteínas inducen la vía de interferencia mediada por ARN (ARNi). Los miARN que ejercen sus efectos reguladores uniéndose a sitios complementarios imperfectos dentro de las regiones no traducidas 3' (UTRs) de sus dianas de ARNm, reprimen la expresión del gen-diana post-transcripcionalmente, aparentemente a nivel de la traducción, a través de un complejo RISC que es similar, o posiblemente idéntico, al que se utiliza para la vía de ARNi. De acuerdo con el control traslacional, los miARN que utilizan este

mecanismo reducen los niveles de proteína de sus genes diana, pero los niveles de mRNA de estos genes solo se ven afectados mínimamente. Los miARN abarcan tanto los miARN naturales como los miARN diseñados artificialmente que pueden dirigirse específicamente a cualquier secuencia de mRNA. Por ejemplo, en una realización, el técnico en la materia puede diseñar construcciones de ARN de horquilla corta expresadas como transcripciones primarias de miARN humano (por ej., miR-30 o miR-21). Este diseño añade un sitio de procesamiento de Drosha a la construcción de horquilla y se ha demostrado que aumenta enormemente la eficiencia de knockdown (Pusch *et al.*, 2004). El tallo de la horquilla consiste en 22-nt de ARNbc (por ej., el antisentido tiene una perfecta complementariedad con la diana deseada) y un bucle de 15-19-nt de un miR humano. Añadiendo el bucle de miR y las secuencias flanqueantes de miR30 en uno o ambos lados de la horquilla se obtiene un aumento de más de 10 veces en el procesamiento de Drosha y Dicer de las horquillas expresadas en comparación con los diseños convencionales de ARNhc sin microARN. El aumento del procesamiento de Drosha y Dicer se traduce en una mayor producción de ARNpi/miARN y una mayor potencia para las horquillas expresadas.

Tal como se utilizan aquí, los términos "ARNhc" o "ARN de horquilla corta" se refieren a la estructura de doble cadena que está formada por una sola hebra de ARN autocomplementario. Las construcciones de ARNhc que contienen una secuencia de nucleótidos idéntica a una porción, ya sea de secuencia codificante o no codificante, del gen diana son preferentes para la inhibición. También se ha comprobado que las secuencias de ARN con inserciones, supresiones y mutaciones de un solo nucleótido relativas a la secuencia diana son efectivas para la inhibición. Se prefiere una identidad de secuencia superior al 90%, o incluso al 100%, entre el ARN inhibidor y la porción del gen diana. En determinadas realizaciones preferentes, la longitud de la porción de formación de dúplex de un ARNhc es de al menos 20, 21 o 22 nucleótidos en longitud, por ej., correspondiendo en tamaño a los productos de ARN producidos por la escisión dependiente de Dicer. En determinadas realizaciones, la construcción de ARNhc tiene al menos 25, 50, 100, 200, 300 o 400 bases de longitud. En determinadas realizaciones, la construcción de ARNhc es de 400-800 bases de longitud. Las construcciones de ARNhc son altamente tolerantes a la variación de la secuencia de bucle y el tamaño del bucle A. Tal como se utiliza aquí, el término "ribocima" se refiere a una molécula de ARN catalíticamente activa capaz de la escisión específica del sitio del ARNm diana. Se han descrito varios subtipos, por ej., la ribocina de cabeza de martillo y la ribocima de horquilla. La actividad catalítica y la estabilidad de la ribocima pueden mejorarse sustituyendo los desoxirribonucleótidos por ribonucleótidos en bases no catalíticas. Aunque las ribocimas que escinden el ARNm en secuencias de reconocimiento específicas del sitio pueden utilizarse para destruir determinados ARNm, se prefiere el uso de ribocimas de cabeza de martillo. Las ribocimas de cabeza de martillo escinden los ARNm en ubicaciones dictadas por las regiones flanqueantes que forman pares de bases complementarias con el ARNm diana. El único requisito es que el ARNm diana tenga la siguiente secuencia de dos bases: 5'-UG-3'. La construcción y producción de ribocimas de cabeza de martillo es bien conocida en la técnica.

Un método preferente de generar un polinucleótido de interés que comprende un ARNpi, un miARN, un ARNhc, o una ribocima comprende una o más secuencias reguladoras, como, por ej., un promotor de pol III constitutivo fuerte, por ej., un promotor de ARNpn U6 humano, un promotor de ARNpn U6 de ratón, un promotor de ARN HI humano y de ratón y un promotor de ARNt-val humano, o un promotor de pol II constitutivo fuerte, como se describe en otra parte del presente documento. Los polinucleótidos de la presente invención, independientemente de la longitud de la secuencia de codificación propiamente dicha, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, como promotores y/o potenciadores, regiones no traducidas (UTR), secuencias de Kozak, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiple, sitios de entrada ribosómica interna (IRES), sitios de reconocimiento de recombinasa (por ej., sitios LoxP, FRT y Att), codones de terminación, señales de terminación transcripcionales y polinucleótidos que codifican polipéptidos autoescindibles, epítipo de identificación, tal como se revelan en otras partes del presente documento o como se conocen en la técnica, de manera que su longitud total puede variar considerablemente. Por consiguiente, se contempla la posibilidad de emplear un fragmento de polinucleótido de casi cualquier longitud, estando la longitud total preferentemente limitada por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante previsto.

Los polinucleótidos pueden prepararse, manipularse y/o expresarse utilizando cualquiera de las diversas técnicas bien establecidas, conocidas y disponibles en la técnica. Para expresar un polipéptido deseado, se puede insertar en el vector apropiado una secuencia de nucleótidos que codifique el polipéptido. Algunos ejemplos de vectores son el plásmido, las secuencias que se replican autónomamente y los elementos transponibles. En otros vectores ejemplares se incluyen, sin limitación, los plásmidos, fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales como el cromosoma artificial de levadura (YAC), el cromosoma artificial bacteriano (BAC) o el cromosoma artificial derivado de PI (PAC), bacteriófagos como el fago lambda o el fago M13, y virus animales. Entre los ejemplos de categorías de virus animales útiles como vectores se incluyen, entre otros, los retrovirus (incluido el lentivirus), los adenovirus, los virus adeno-asociados, los herpesvirus (por ej., el virus del herpes simple), los poxvirus, los baculovirus, los papilomavirus y los papovavirus (por ej., el SV40). Ejemplos de vectores de expresión son los vectores pCIneo (Promega) para la expresión en células de mamífero; pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™, y pLenti6.2/V5-GW/lacZ (Invitrogen) para la transferencia y expresión de genes mediada por lentivirus en células de mamífero. En ejemplos particulares, las secuencias de codificación de las proteínas quiméricas aquí

desveladas pueden ligarse a dichos vectores de expresión para la expresión de la proteína quimérica en células de mamífero.

5 Los "elementos de control" o "secuencias reguladoras" presentes en un vector de expresión son las regiones no traducidas del vector —origen de la replicación, casetes de selección, promotores, potenciadores, señales de iniciación de traducción (secuencia de Shine Dalgarno o secuencia de Kozak), intrones, una secuencia de poliadenilación, regiones no traducidas de 5' y 3'— que interactúan con proteínas celulares hospedadoras para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Dichos elementos pueden variar en su potencia y especificidad. Dependiendo del sistema vectorial y del hospedador utilizado, se puede usar cualquier número de elementos de transcripción y traducción adecuados, incluidos los promotores ubicuos y los promotores inducibles.

10 En ejemplos particulares, un vector que se utilizará en la práctica de la materia revelada, incluyendo entre otros, los vectores de expresión y los vectores virales, incluirá secuencias de control exógenas, endógenas o heterólogas, como promotores y/o potenciadores. Una secuencia de control "endógena" es aquella que se enlaza de forma natural con un gen determinado en el genoma. Una secuencia de control "exógena" es aquella que se yuxtapone a un gen mediante manipulación genética (es decir, técnicas de biología molecular) de manera que la transcripción de ese gen está dirigida por el potenciador/promotor enlazado. Una secuencia de control "heteróloga" es una secuencia exógena que proviene de una especie diferente a la célula que se está manipulando genéticamente.

15 El término "promotor", tal como se utiliza aquí, se refiere a un sitio de reconocimiento de un polinucleótido (ADN o ARN) al que se une una ARN polimerasa. Una ARN polimerasa inicia y transcribe polinucleótidos enlazados operativamente al promotor. En realizaciones particulares, los promotores operativos en células de mamífero comprenden una región rica en AT situada aproximadamente de 25 a 30 bases por delante del sitio donde se inicia la transcripción y/u otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases por delante del inicio de la transcripción, una región de CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido.

20 El término "potenciador" se refiere a un segmento de ADN que contiene secuencias capaces de proporcionar una transcripción mejorada y que, en algunos casos, puede funcionar independientemente de su orientación en relación con otra secuencia de control. Un potenciador puede funcionar de forma cooperativa o aditiva con promotores y/u otros elementos potenciadores. El término "promotor/potenciador" se refiere a un segmento de ADN que contiene secuencias capaces de proporcionar tanto funciones de promotor como de potenciador.

25 La expresión "enlazado operativamente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. En una realización, el término se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de la expresión del ácido nucleico (como un promotor y/o potenciador) y una segunda secuencia de polinucleótidos, *por ej.*, un polinucleótido de interés, en el que la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

30 Tal como se utiliza aquí, la expresión "secuencia de control de la expresión constitutiva" se refiere a un promotor, potenciador o promotor/potenciador que permite de forma continua o permanente la transcripción de una secuencia enlazada operativamente. Una secuencia de control de la expresión constitutiva puede ser un promotor, potenciador o promotor/potenciador "ubicuo" que permite la expresión en una amplia variedad de tipos de células y tejidos o un promotor, potenciador o promotor/potenciador "específico de la célula", "específico del tipo de célula", "específico del linaje celular" o "específico del tejido" que permite la expresión en una variedad restringida de tipos de células y tejidos, respectivamente.

35 Entre las secuencias de control de la expresión ubicua ilustrativas que se pueden utilizar ejemplos particulares se incluyen entre otras, un promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), un virus del simio 40 (SV40) (*por ej.*, temprano o tardío), un promotor de LTR del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), un promotor de LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV), un promotor del virus del herpes simple (HSV) (timidina quinasa), H5, P7.5, y promotores PI 1 del virus vacuna, un promotor del factor de elongación 1-alfa (Efla), respuesta temprana al crecimiento 1 (EGR1), ferritina H (FerH), ferritina L (FerL), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), factor de iniciación de la traducción eucariota 4A1 (EIF4A1), proteína de choque térmico 70kDa 5 (HSPA5), proteína de choque térmico 90kDa beta, miembro 1 (HSP90B1), proteína de choque térmico 70kDa (HSP70),  $\beta$ -kinesina ( $\beta$ -KTN), el locus ROSA 26 humano (Irions *et al*, Nature Biotechnology 25, 1477-1482 (2007)), un promotor de la ubiquitina C (UBC), un promotor de la fosfoglicerato quinasa-1 (PGK), un potenciador de citomegalovirus/pollos actina  $\beta$  (CAG), un promotor de actina  $\beta$  y un promotor (MND) potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo, con la región de control negativo eliminada y el sitio de unión al cebador dl587rev sustituido (Challita *et al*, J Virol. 69(2):748-55 (1995)).

40 En un ejemplo en particular, puede ser conveniente expresar un polinucleótido que comprende un CAR de un promotor que proporciona una expresión estable y a largo plazo del CAR en los linfocitos T y a niveles suficientes para redirigir los linfocitos T a las células que expresan el antígeno diana. En un ejemplo preferente, el promotor es un promotor MND.

En un ejemplo, un vector de la revelación comprende un promotor MND que comprende una o más inserciones, supresiones, sustituciones o modificaciones de nucleótidos que aumentan, disminuyen o estabilizan la actividad del promotor MND.

5 Tal como se utiliza aquí, la "expresión condicional" puede referirse a cualquier tipo de expresión condicional, incluyendo entre otras, la expresión inducible; la expresión reprimible; la expresión en células o tejidos que tengan un estado fisiológico, biológico, o enfermedad particular, *etc.* Esta definición no pretende excluir la expresión específica de un tejido o tipo de célula. Determinados ejemplos proporcionan una expresión condicional de un polinucleótido de interés, *por ej.*, la expresión se controla sometiendo a una célula, un tejido, un organismo, *etc.*, a un tratamiento o condición que hace que el polinucleótido se exprese o que provoque un aumento o disminución de la expresión del polinucleótido codificado por el polinucleótido de interés.

15 Entre los ejemplos ilustrativos de promotores/sistemas inducibles se incluyen entre otros, los promotores inducibles por esteroides, como los promotores de los genes que codifican los receptores de glucocorticoides o de estrógenos (inducibles por tratamiento con la hormona correspondiente), el promotor de la metalotionina (inducible por tratamiento con diversos metales pesados), el promotor MX-1 (inducible por interferón), el sistema regulable por mifepristona "GeneSwitch" (Sirin *et al.*, 2003, *Gene*, 323:67), el *cumate inducible gene switch* (WO 2002/088346), los sistemas reguladores dependientes de tetraciclina, *etc.*

20 La expresión condicional también puede lograrse mediante el uso de una recombinasa de ADN específica del sitio. Según determinadas realizaciones de la invención, el vector comprende al menos un (típicamente dos) sitio(s) para la recombinación mediada por una recombinasa específica del sitio. Tal como se utilizan aquí, los términos "recombinasa" o "recombinasa específica del sitio" incluyen proteínas excitantes o integradoras, enzimas, cofactores o proteínas asociadas que intervienen en reacciones de recombinación que implican uno o más sitios de recombinación (*por ej.*, dos, tres, cuatro, cinco, siete, diez, doce, quince, veinte, treinta, cincuenta, *etc.*), que pueden ser proteínas tipo salvaje (ver Landy, *Current Opinion in Biotechnology* 3:699-707 (1993)), o mutantes, derivados (*por ej.*, proteínas de fusión que contienen las secuencias de proteínas de recombinación o fragmentos de ellas), fragmentos y variantes de ellas. Entre los ejemplos ilustrativos de recombinasas adecuadas para el uso en realizaciones particulares de la presente invención se incluyen entre otros: Cre, Int, IHF, Xis, Flp, Fis, Hin, Gin,  $\Phi$ C31, Cin, resolvasa Tn3, TndX, XerC, XerD, TnpX, Hjc, Gin, SpCCEI, y ParA.

35 Los vectores pueden comprender uno o más sitios de recombinación para cualquiera de una amplia variedad de recombinasas específicas del sitio. Debe entenderse que el sitio diana de una recombinasa específica de sitio es adicional a cualquier sitio o sitios necesarios para la integración de un vector, *por ej.*, un vector retroviral o un vector lentiviral. Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "sitio de recombinación", "sitio de recombinación específico de sitio" se refieren a una secuencia de ácido nucleico particular a la que una recombinasa reconoce y se une.

40 Por ejemplo, un sitio de recombinación para recombinasa Cre es loxP, que es una secuencia de 34 pares de base que comprende dos repeticiones invertidas de 13 pares de base (que sirven como sitios de unión de recombinasa) que flanquean una secuencia núcleo de 8 pares de base (ver la Figura 1 de Sauer, B., *Current Opinion in Biotechnology* 5:521-527 (1994)). Otros sitios de loxP ejemplares son, entre otros: lox511 (Hoess *et al.*, 1996; Bethke y Sauer, 1997), lox5171 (Lee y Saito, 1998), lox2272 (Lee and Saito, 1998), m2 (Langer *et al.*, 2002), lox71 (Albert *et al.*, 1995), y lox66 (Albertsal, 1995).

45 Los sitios de reconocimiento adecuados para la recombinasa FLP son, entre otros: FRT (McLeod, *et al.*, 1996), F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> (Schlake y Bode, 1994), F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub> (Schlake y Bode, 1994), FRT(LE) (Senecoff *et al.*, 1988), FRT(RE) (Senecoff *et al.*, 1988).

50 Otros ejemplos de secuencias de reconocimiento son las secuencias attB, attP, attL y attR, que se reconocen por la enzima recombinasa Integrasa  $\lambda$ , *por ej.*,  $\phi$ -c31. La SSR  $\phi$ C31 media la recombinación solo entre los sitios heterotípicos attB (34 pb de longitud) y attP (39 pb de longitud) (Groth *et al.*, 2000). attB y el attP, llamados así por los sitios de unión de integrasa del fago en los genomas bacteriano y fágico, respectivamente, ambos contienen repeticiones invertidas imperfectas que probablemente están unidas por homodímeros  $\phi$ C31 (Groth *et al.*, 2000). Los sitios de producto, attL y attR, son eficazmente inertes a la recombinación mediada por  $\phi$ C31 (Belteki *et al.*, 2003), lo que hace que la reacción sea irreversible. Para catalizar las inserciones, se ha descubierto que las inserciones de ADN portador de attB en un sitio de attP genómico son más fáciles de realizar que un sitio de attP en un sitio de attB genómico (Thyagarajan *et al.*, 2001; Belteki *et al.*, 2003). Así, las estrategias típicas posicionan mediante recombinación homóloga un "sitio de acoplamiento" portador de attP en un locus definido, que luego se asocia con una secuencia entrante portadora de attB para su inserción.

60 Tal como se utiliza aquí, un "sitio de entrada al ribosoma interno" o "IRES" se refiere a un elemento que promueve la entrada directa del ribosoma interno al codón de iniciación, como el ATG, de un cistron (una región codificadora de

proteínas), lo que conduce a la traducción independiente de cap del gen. ver, *por ej.*, Jackson *et al.*, 1990. *Trends Biochem Sci* 15(12):477-83) y Jackson y Kaminski. 1995. *RNA* 1(10):985-1000. En ejemplos en particular, los vectores contemplados por la presente revelación, incluyen uno o más polinucleótidos de interés que codifican uno o más polipéptidos. En ejemplos en particular, para lograr una traducción eficiente de cada uno de la pluralidad de polipéptidos, las secuencias de polinucleótidos pueden estar separadas por una o más secuencias de IRES o secuencias de polinucleótidos que codifican polipéptidos autoescindibles.

Tal como se utiliza aquí, el término "secuencia de Kozak" se refiere a una secuencia corta de nucleótidos que facilita en gran medida la unión inicial de ARNm a la subunidad pequeña del ribosoma y aumenta la traducción. La secuencia de Kozak de consenso es (GCC)RCCATGG (ID SEC. N°: 27), donde R es una purina (A o G) (Kozak, 1986. *Cell*. 44(2):283-92, y Kozak, 1987. *Nucleic Acids Res.* 15(20):8125-48). En ejemplos en particular, los vectores contemplados por la presente revelación, comprenden polinucleótidos que tienen una secuencia de Kozak de consenso y que codifican un polipéptido deseado, *por ej.*, un CAR.

En algunas realizaciones de la presente invención, un polinucleótido o una célula que alberga el polinucleótido utiliza un gen suicida, incluyendo un gen suicida inducible para reducir el riesgo de toxicidad directa y/o proliferación incontrolada. En aspectos específicos, el gen suicida no es inmune al hospedador que alberga el polinucleótido o célula. Un determinado ejemplo de un gen suicida que puede utilizarse es la caspasa9 o la caspasa8 o la citosina desaminasa. La caspasa-9 puede activarse usando un inductor químico específico de dimerización (CID).

En determinadas realizaciones, los vectores comprenden segmentos de genes que hacen que las células efectoras inmunes de esta invención, *por ej.*, los linfocitos T, sean susceptibles de selección negativa *in vivo*. Por "selección negativa" se entiende que la célula infundida puede eliminarse como resultado de un cambio en la condición *in vivo* del individuo. El fenotipo seleccionable negativo puede ser el resultado de la inserción de un gen que confiere sensibilidad a un agente administrado, *por ej.*, un compuesto. Se conocen en la técnica los genes seleccionables negativos, entre los que se incluyen los siguientes: el gen de timidina cinasa del virus del herpes simple tipo I (HSV-I TK) (Wigler *et al.*, *Cell* 11:223, 1977) que confiere sensibilidad al ganciclovir; el gen de la hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HPRT), el gen de la adenosina fosforribosiltransferasa celular (APRT) y la citosina desaminasa bacteriana (Mullen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89:33 (1992)).

En algunas realizaciones, las células efectoras inmunes modificadas genéticamente, como los linfocitos T, comprenden un polinucleótido que comprende además un marcador positivo que permite la selección de células del fenotipo seleccionable negativo *in vitro*. El marcador seleccionable positivo puede ser un gen que, al ser introducido en la célula hospedadora, expresa un fenotipo dominante que permite la selección positiva de las células portadoras del gen. Los genes de este tipo son conocidos por los expertos en la materia, e incluyen entre otros, el gen de la higromicina-B fosfotransferasa (hph) que confiere resistencia a la higromicina B, el gen de aminoglucósido fosfotransferasa (neo o aph) de Tn5 que codifica la resistencia al antibiótico G418, el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR), el gen de adenosina desaminasa (ADA) y el gen de resistencia múltí-fármacos (MDR).

Preferentemente, el marcador seleccionable positivo y el elemento seleccionable negativo están enlazados de tal manera que la pérdida del elemento seleccionable negativo necesariamente va acompañada de la pérdida del marcador seleccionable positivo. Aún más preferentemente, los marcadores seleccionables positivos y negativos se fusionan de modo que la pérdida de uno de ellos conduce obligatoriamente a la pérdida del otro. Un ejemplo de polinucleótido fusionado que da como producto de expresión un polipéptido que confiere tanto las características de selección positiva como negativa deseadas descritas anteriormente es un gen de fusión de la higromicina fosfotransferasa timidina quinasa (HyTK). La expresión de este gen produce un polipéptido que confiere resistencia a la higromicina B para la selección positiva *in vitro*, y sensibilidad al ganciclovir para la selección negativa *in vivo*. ver Lupton S. D., *et al.*, *Mol. and Cell. Biology* 11:3374-3378, 1991. Además, en ejemplos preferentes, los polinucleótidos de la presente revelación que codifican los receptores quiméricos se encuentran en vectores retrovirales que contienen el gen fusionado, en particular los que confieren resistencia a la higromicina B para la selección positiva *in vitro*, y sensibilidad al ganciclovir para la selección negativa *in vivo*, *por ej.*, el vector retroviral de HyTK descrito en Lupton, S. D. *et al.* (1991), *supra*. Ver también las publicaciones WO/1992/008796 y WO/1994/028143, de S. D. Lupton, en las que se describe el uso de genes de fusión bifuncionales seleccionables derivados de la fusión de un marcador seleccionable positivo dominante con marcadores seleccionables negativos.

Los marcadores seleccionables positivos preferentes se derivan de genes seleccionados del grupo formado por hph, nco y gpt, y los marcadores seleccionables negativos preferentes se derivan de genes seleccionados del grupo formado por citosina desaminasa, HSV-I TK, VZV TK, HPRT, APRT y gpt. Los marcadores especialmente preferidos son genes de fusión bifuncionales seleccionables, donde el marcador seleccionable positivo se deriva de hph o neo, y el marcador seleccionable negativo se deriva de la citosina desaminasa o de un gen TK o marcador seleccionable.

## F. Vectores virales

En ejemplos en particular, una célula (*por ej.*, un linfocito T) se transduce con un vector retroviral, *por ej.*, un vector lentiviral, que codifica un CAR. Por ejemplo, el vector que comprende un promotor MND y codifica un CAR que combina un dominio de unión específica a antígeno de un anticuerpo que se une a un receptor de folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha_2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, o un polipéptido VEGFR2 con un dominio de señalización intracelular de CD3 $\xi$ , CD28, 4-1BB, Ox40, o cualquier combinación de estos. Por lo tanto, estos linfocitos T transducidos pueden provocar una respuesta estable, a largo plazo y persistente de linfocitos T mediados por CAR.

Los retrovirus son una herramienta común para generar genes (Miller, 2000, *Nature*. 357: 455-460). En ejemplos en particular, se utiliza un retrovirus para generar un polinucleótido que codifica un receptor de antígenos quiméricos (CAR) a una célula. Tal como se utiliza aquí, el término "retrovirus" se refiere a un virus de ARN que transcribe en forma inversa su ARN genómico en una copia lineal de ADN bicatenario y posteriormente integra covalentemente su ADN genómico en un genoma hospedador. Una vez que el virus se integra en el genoma hospedador, se le llama "provirus". El provirus sirve de plantilla para la ARN polimerasa II y dirige la expresión de las moléculas de ARN que codifican las proteínas y enzimas estructurales necesarias para producir nuevas partículas virales.

Entre los retrovirus ilustrativos adecuados para el uso en ejemplos particulares se incluyen entre otros: el virus de la leucemia murina de Moloney (M-MuLV), virus del sarcoma murino de Moloney (MoMSV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV), virus de la leucemia de gibones (GaLV), virus de la leucemia felina (FLV), espumavirus, virus de la leucemia murina Friend, virus de las células madre murinas (MSCV) y virus del sarcoma de Rous (RSV) y lentivirus.

Tal como se utiliza aquí, el término "lentivirus" se refiere a un grupo (o género) de retrovirus complejos. Los lentivirus ilustrativos incluyen entre otros: el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana; incluyendo VIH tipo 1, y VIH tipo 2); el virus del Maedi-Visna (VMV); el virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV); el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV); el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV); el virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV); y el virus de la inmunodeficiencia en simios (SIV). En una realización, se prefieren las cadenas principales de vectores basados en VIH (*es decir*, elementos de la secuencia de activación en cis del VIH). En realizaciones particulares, se utiliza un lentivirus para generar un polinucleótido que comprende un promotor MND y que codifica un CAR en una célula.

Los vectores retrovirales y, más en particular, los vectores lentivirales, pueden utilizarse en la práctica de ejemplos particulares de la presente revelación. Por consiguiente, el término "retrovirus" o "vector retroviral", tal como se utiliza aquí, incluye los términos "lentivirus" y "vectores lentivirales", respectivamente.

El término "vector" se utiliza aquí para referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transferir o transportar otra molécula de ácido nucleico. El ácido nucleico transferido está generalmente enlazado a, *por ej.*, insertado en la molécula de ácido nucleico vectorial. Un vector puede incluir secuencias que dirigen la replicación autónoma en una célula, o puede incluir secuencias suficientes para permitir la integración en el ADN de la célula hospedadora. Los vectores útiles incluyen, *por ej.*, los plásmidos (*por ej.*, plásmidos de ADN o plásmidos de ARN), transposones, cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos y vectores virales. Los vectores virales útiles incluyen, *por ej.*, retrovirus y lentivirus defectuosos en replicación.

Como será evidente para cualquier experto en la materia, el término "vector viral" se utiliza ampliamente para referirse ya sea a una molécula de ácido nucleico (*por ej.*, un plásmido de transferencia) que incluye elementos de ácido nucleico derivados de virus que típicamente facilitan la transferencia de la molécula de ácido nucleico o la integración en el genoma de una célula o a una partícula viral que media la transferencia de ácido nucleico. Las partículas virales típicamente incluirán varios componentes virales y a veces también componentes de la célula hospedadora además de ácido(s) nucleico(s).

El término vector viral puede referirse a un virus o a una partícula viral capaz de transferir un ácido nucleico a una célula o al propio ácido nucleico transferido. Los vectores virales y los plásmidos de transferencia contienen elementos genéticos estructurales y/o funcionales que se derivan principalmente de un virus. El término "vector retroviral" se refiere a un vector viral o plásmido que contiene elementos genéticos estructurales y funcionales, o porciones de estos, que se derivan principalmente de un retrovirus. El término "vector lentiviral" se refiere a un vector viral o plásmido que contiene elementos genéticos estructurales y funcionales, o porciones de estos, incluyendo LTRs que se derivan principalmente de un

lentivirus. El término "vector híbrido" se refiere a un vector, LTR u otro ácido nucleico que contiene tanto secuencias retrovirales, *por ej.*, lentivirales, como secuencias virales no lentivirales. En un ejemplo, un vector híbrido se refiere a un vector o plásmido de transferencia que comprende una secuencia retroviral, *por ej.*, lentiviral, secuencias para la transcripción inversa, replicación, integración y/o empaquetamiento.

5 En realizaciones particulares, los términos "vector lentiviral" y "vector de expresión lentiviral" pueden utilizarse para referirse a plásmidos de transferencia lentiviral y/o a partículas lentivirales infecciosas. Cuando se hace referencia aquí a elementos tales como sitios de clonación, promotores, elementos reguladores, ácidos nucleicos heterólogos, *etc.*, debe entenderse que las secuencias de estos elementos están presentes en forma de ARN en las partículas lentivirales de la invención y están presentes en forma de ADN en los plásmidos de ADN de la revelación.

10 En cada extremo del provirus hay estructuras llamadas "repeticiones terminales largas" o "LTRs". La expresión "repetición terminal larga (LTR)" se refiere a dominios de pares de bases situados en los extremos de los ADNs retrovirales que, en su contexto de secuencia natural, son repeticiones directas y contienen regiones U3, R y U5. Las LTRs generalmente cumplen funciones fundamentales para la expresión de genes retrovirales (*por ej.*, la promoción, iniciación y poliadenilación de transcripciones de genes) y para la replicación viral. La LTR contiene numerosas señales reguladoras, incluyendo elementos de control transcripcional, señales de poliadenilación y secuencias necesarias para la replicación e integración del genoma viral. La LTR viral se divide en tres regiones llamadas U3, R y U5. La región U3 contiene los elementos potenciadores y promotores. La región U5 es la secuencia entre el sitio de unión al cebador y la región R y contiene la secuencia de poliadenilación. La región R (repetición) está flanqueada por las regiones U3 y U5. La LTR está compuesta por las regiones U3, R y U5 y aparece en los extremos 5' y 3' del genoma viral. Adyacentes al 5' de la LTR se encuentran las secuencias necesarias para la transcripción inversa del genoma (el sitio de unión al cebador ARNt) y para el empaquetamiento eficiente del ARN viral en partículas (el sitio Psi).

25 Tal como se utiliza aquí, el término "señal de empaquetamiento" o "secuencia de empaquetamiento" se refiere a las secuencias localizadas dentro del genoma retroviral que se requieren para la inserción del ARN viral en la cápside o partícula viral, ver, *por ej.*, Clever *et al.*, 1995. *J. of Virology*, Vol. 69, N° 4; págs. 2101-2109. Varios vectores retrovirales utilizan la señal de empaquetamiento mínima (también denominada secuencia psi [ $\Psi$ ]) necesaria para la encapsulación del genoma viral. Así pues, tal como se utilizan aquí, los términos "secuencia de empaquetamiento", "señal de empaquetamiento", "psi" y el símbolo " $\Psi$ " se utilizan en referencia a la secuencia no codificante necesaria para la encapsulación de las cadenas de ARN retroviral durante la formación de partículas virales.

35 En varias realizaciones, los vectores comprenden 5' LTR y/o 3' LTRs modificadas. Una o ambas LTRs pueden comprender una o más modificaciones, incluyendo entre otras, una o más supresiones, inserciones o sustituciones. A menudo se realizan modificaciones de la 3' LTR para mejorar la seguridad de los sistemas lentivirales o retrovirales haciendo que la replicación de los virus sea defectuosa. Tal como se utiliza aquí, el término "con defectos de replicación" se refiere a los virus que no son capaces de una replicación completa y eficaz de manera que no se producen viriones infecciosos (*por ej.*, progenie lentiviral con defectos de replicación). El término "competente para la replicación" se refiere a un virus tipo salvaje o a un virus mutante que es capaz de replicarse, de manera que la replicación viral del virus es capaz de producir viriones infecciosos (*por ej.*, progenie lentiviral competente para la replicación).

40 Los vectores "autoinactivables" (SIN) se refieren a los vectores defectuosos en replicación, *por e.*, los vectores retrovirales o lentivirales, en los que la región promotora-potenciadora derecha de LTR (3'), conocida como la región U3, se ha modificado (*por ej.*, por supresión o sustitución) para impedir la transcripción viral más allá de la primera ronda de replicación viral. Esto se debe a que la región derecha de LTR (3') U3 se utiliza como plantilla para la región izquierda de LTR (5') U3 durante la replicación del virus y, por lo tanto, la transcripción viral no puede hacerse sin el potenciador-promotor U3. En una realización ulterior de la presente invención, la LTR 3' se modifica de tal manera que la región U5 se sustituye, *por ej.*, por una secuencia de poli(A) ideal. Cabe señalar que las modificaciones en las LTRs, como las modificaciones en LTR 3', LTR 5', o LTRs 3' y 5', también se incluyen en la presente invención.

50 Una mejora adicional de la seguridad es la sustitución de la región U3 de la LTR 5' por un promotor heterólogo para impulsar la transcripción del genoma viral durante la producción de partículas virales. Entre los ejemplos de promotores heterólogos que pueden utilizarse figuran, *por ej.*, promotores del virus del simio 40 (SV40) (*por ej.*, temprano o tardío), el citomegalovirus (CMV) (*por ej.*, inmediatamente temprano), el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), el virus del sarcoma de Rous (RSV) y promotores del virus del herpes simple (HSV) (timidina quinasa). Los promotores típicos son capaces de impulsar altos niveles de transcripción de forma independiente de Tat. Esta sustitución reduce la posibilidad de recombinación para generar un virus competente para la replicación porque no hay una secuencia U3 completa en el sistema de producción de virus. En determinadas realizaciones, el promotor heterólogo tiene ventajas adicionales en el control de la forma en que se transcribe el genoma viral. Por ejemplo, el promotor heterólogo puede ser inducible, de modo que la transcripción de todo o parte del genoma viral solo se producirá cuando estén presentes los factores de inducción.

Los factores de inducción incluyen entre otros, uno o más compuestos químicos o condiciones fisiológicas, como la temperatura o el pH, en las que se cultivan las células hospedadoras.

5 En algunas realizaciones, los vectores virales comprenden un elemento TAR. El término "TAR" se refiere al elemento genético de "respuesta de trans-activación" ubicado en la región R de las LTR lentivirales (*por ej.*, VIH). Este elemento interactúa con el elemento genético trans-activador lentiviral (*tat*) para mejorar la replicación viral. Sin embargo, este elemento no es necesario en las realizaciones donde la región U3 de la LTR 5' se sustituye por un promotor heterólogo.

10 La "región R" se refiere a la región dentro de las LTR retrovirales que comienza al inicio del grupo de encapsulación (*es decir*, el inicio de la transcripción) y termina inmediatamente antes del inicio del tracto poli-A. La región R también se define como flanqueada por las regiones U3 y U5. La región R desempeña una función durante la transcripción inversa al permitir la transferencia de ADN naciente de un extremo del genoma al otro.

15 Tal como se utiliza aquí, el término "elemento FLAP" se refiere a un ácido nucleico cuya secuencia incluye el tracto central de polipurina y las secuencias de terminación central (cPPT y CTS) de un retrovirus, *por ej.*, el VIH-1 o el VIH-2. Los elementos FLAP adecuados se describen en la patente USA N° 6.682.907 y en Zennou, *et al.*, 2000, Cell, 101:173. Durante la transcripción inversa del VIH-1, la iniciación central del ADN de hebra positiva en el tracto central de polipurina (cPPT) y la terminación central en la secuencia de terminación central (CTS) conducen a la formación de una estructura de ADN de tres hebras: el ADN flap central del VIH-1. Aunque no se pretende limitarse a ninguna teoría, el ADN flap puede actuar como un determinante de activación en cis de la importación nuclear del genoma lentiviral y/o puede aumentar el título del virus. En ejemplos en particular, las cadenas principales de vectores retrovirales o lentivirales comprenden uno o más elementos FLAP delante o después de los genes heterólogos de interés en los vectores. Por ejemplo, en ejemplos particulares un plásmido de transferencia incluye un elemento FLAP. En una realización, un vector de la presente invención comprende un elemento FLAP aislado del VIH-1.

25 En un ejemplo, los vectores de transferencia retroviral o lentiviral comprenden uno o más elementos de exportación. El término "elemento de exportación" se refiere a un elemento regulatorio post-transcripcional de activación en cis que regula el transporte de una transcripción de ARN desde el núcleo hasta el citoplasma de una célula. Entre los ejemplos de elementos de exportación de ARN se incluyen entre otros, el elemento regulatorio Rev del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (RRE) (*ver, por ej.*, Cullen *et al.*, 1991. J. Virol. 65: 1053; y Cullen *et al.*, 1991. Cell 58: 423), y el elemento regulatorio post-transcripcional del virus de la hepatitis B (HPRE). Por lo general, el elemento de exportación de ARN se coloca dentro de la UTR 3' de un gen, y se puede insertar como una o varias copias.

35 En realizaciones particulares, la expresión de secuencias heterólogas en los vectores virales aumenta mediante la incorporación de elementos de respuesta post-transcripcional, sitios de poliadenilación eficientes y, opcionalmente, señales de terminación de transcripción en los vectores. Diversos elementos de respuesta post-transcripcional pueden aumentar la expresión de un ácido nucleico heterólogo en la proteína, *por ej.*, el elemento regulatorio post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE; Zufferey *et al.*, 1999, J. Virol, 73:2886); el elemento regulatorio post-transcripcional presente en el virus de la hepatitis B (HPRE) (Huang *et al.*, Mol. Cell. Biol, 5:3864); y similares (Liu *et al.*, 1995, Genes Dev., 9:1766). En realizaciones en particular, vectores de la presente invención comprenden un elemento regulatorio post-transcripcional como un WPRE o un HPRE.

45 En realizaciones particulares, los vectores de la invención carecen o no comprenden un elemento regulatorio post-transcripcional como el WPRE o el HPRE porque en algunos casos estos elementos aumentan el riesgo de transformación celular y/o no aumentan sustancial o significativamente la cantidad de transcripción de ARNm o aumentan la estabilidad del ARNm. Por lo tanto, en algunas realizaciones, vectores de la presente invención carecen o no comprenden un WPRE o un HPRE como medida de seguridad añadida.

50 Los elementos que dirigen la terminación y poliadenilación eficientes de las transcripciones de ácidos nucleicos heterólogos aumentan la expresión de genes heterólogos. Las señales de terminación de transcripción se encuentran generalmente después de la señal de poliadenilación. En realizaciones en particular, los vectores comprenden una secuencia de poliadenilación 3' de un polinucleótido que codifica un polipéptido a expresar. El término "sitio poli-A" o "secuencia poli-A", tal como se utiliza aquí, denota una secuencia de ADN que dirige tanto la terminación como la poliadenilación de la transcripción de ARN naciente por ARN polimerasa II. Las secuencias de poliadenilación pueden promover la estabilidad del ARNm mediante la adición de una cola de poli-A en el extremo 3' de la secuencia de codificación y, por lo tanto, contribuyen a aumentar la eficiencia translacional. Es deseable la poliadenilación eficiente de la transcripción recombinante, ya que las transcripciones que carecen de una cola de poli-A son inestables y se degradan rápidamente. Entre los ejemplos ilustrativos de señales de poli-A que pueden utilizarse en un vector de la invención, se incluyen una secuencia de poli-A ideal (*por ej.*, AATAAA, ATAAAA, AGTAAA), una secuencia de poli-A de la hormona de crecimiento bovina (BGHpA), una secuencia de poli-A de globina  $\beta$  de conejo (r $\beta$ gpA), u otra secuencia de poli-A heteróloga o endógena adecuada conocida en la técnica.

60

5 En determinados ejemplos, un vector retroviral o lentiviral comprende además uno o más elementos aisladores. Los elementos aisladores pueden contribuir a proteger las secuencias expresadas por lentivirus, *por ej.*, los polipéptidos terapéuticos, de los efectos del sitio de integración, que pueden estar mediados por elementos de activación en cis presentes en el ADN genómico y conducir a una expresión desregulada de secuencias transferidas (*es decir*, efecto de posición; ver, *por ej.*, Burgess-Beusse *et al.*, 2002, Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU., 99:16433; y Zhan *et al.*, 2001, Hum. Genet., 109:471). En algunas realizaciones, los vectores de transferencia comprenden uno o más elementos aisladores en la LTR 3' y al integrarse el provirus en el genoma hospedador, el provirus comprende uno o más aisladores tanto en LTR 5' como en LTR 3', en virtud de la duplicación de las LTR 3'. Entre los aisladores adecuados para el uso en la invención 10 figuran, entre otros, el aislador de globina β de pollo (ver Chung *et al.*, 1993. Cell 74:505; Chung *et al.*, 1997. PNAS 94:575; y Bell *et al.*, 1999. Cell 98:387). En los ejemplos de elementos aisladores se incluye, entre otros, un aislador de un locus de globina β, como el pollo HS4.

15 Según determinadas realizaciones específicas de la presente invención, la mayoría o todas las secuencias del esqueleto de los vectores virales se derivan de un lentivirus, *por ej.*, el VIH-1. Sin embargo, debe entenderse que pueden utilizarse, o combinarse, muchas fuentes diferentes de secuencias retrovirales y/o lentivirales, y pueden acomodarse numerosas sustituciones y modificaciones en algunas de las secuencias lentivirales sin afectar a la capacidad de un vector de transferencia para realizar las funciones aquí descritas. Además, es conocida por los expertos en la materia una variedad de vectores lentivirales, ver Naldini *et al.*, (1996a, 1996b y 1998); Zufferey *et al.*, (1997); Dull *et al.*, 1998, patentes USA N° 20 6.013.516; y 5.994.136, muchos de los cuales pueden adaptarse para producir un vector viral o un plásmido de transferencia de la invención.

25 Los vectores de esta invención comprenden un promotor enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido de CAR. Los vectores pueden tener una o más LTRs, donde cada LTR comprende una o más modificaciones, como una o más sustituciones, adiciones o supresiones de nucleótidos. Los vectores pueden comprender además uno o más elementos accesorios para aumentar la eficiencia de la transducción (*por ej.*, una cPPT/FLAP), un empaquetamiento viral (*por ej.*, una señal de empaquetamiento Psi (Ψ), RRE), y/u otros elementos que aumenten la expresión génica terapéutica (*por ej.*, secuencias poli(A)), y pueden comprender opcionalmente un WPRE o HPRE.

30 En una realización particular, el vector de transferencia de la invención comprende una LTR retroviral izquierda (5'); un tracto central de polipurina/ADN flap (cPPT/FLAP); un elemento de exportación retroviral; un promotor MND enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido de CAR contemplado aquí; y una LTR retroviral derecha (3'); y opcionalmente un WPRE o HPRE.

35 En una realización en particular, el vector de transferencia de la invención comprende una LTR retroviral izquierda (5'); un elemento de exportación retroviral; un promotor MND enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido de CAR contemplado aquí; una LTR retroviral derecha (3'); y una secuencia de poli-A; y opcionalmente un WPRE o HPRE. En otra realización en particular, la presente invención proporciona un vector lentiviral que comprende: 40 una LTR izquierda (5'); un cPPT/FLAP; un RRE; un promotor MND enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido de CAR contemplado aquí; una LTR derecha (3'); y una secuencia de poliadenilación; y opcionalmente un WPRE o HPRE.

45 En una determinada realización, la invención proporciona un vector lentiviral que comprende: una LTR izquierda (5') de VIH-1; una señal de empaquetamiento Psi (Ψ); un cPPT/FLAP; un RRE; un promotor MND enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido de CAR contemplado aquí; una LTR derecha (3') autoinactivable (SIN) de VIH-1; y una secuencia de poliadenilación de globina β de conejo; y opcionalmente un WPRE o HPRE.

50 En otra realización, la invención proporciona un vector que comprende: al menos una LTR; un tracto central de polipurina/ADN flap (cPPT/FLAP); un elemento de exportación retroviral; Y un promotor MND enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido de CAR contemplado aquí; y opcionalmente un WPRE o HPRE.

55 En una realización en particular, la invención proporciona un vector que comprende al menos una LTR; un cPPT/FLAP; un RRE; un promotor MND enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido de CAR contemplado aquí; y una secuencia de poliadenilación; y opcionalmente un WPRE o HPRE.

60 En una determinada realización, la invención proporciona un vector que comprende al menos una LTR SIN de VIH-1; una señal de empaquetamiento Psi (Ψ); un cPPT/FLAP; un RRE; un promotor MND enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido de CAR contemplado aquí; y una secuencia de poliadenilación de globina β de conejo; y opcionalmente un WPRE o HPRE.

El experto en la materia apreciaría que se pueden crear muchas otras realizaciones diferentes a partir de las realizaciones existentes de la presente invención. Una "célula hospedadora" incluye las células transfectadas, infectadas o transducidas *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* con un vector recombinante o un polinucleótido de la invención. Las células hospedadoras pueden incluir células empaquetadoras, células productoras y células infectadas con vectores virales. En ejemplos particulares, se administran células hospedadoras infectadas con un vector viral de la invención a un sujeto que necesita tratamiento. En determinados ejemplos, el término "célula diana" se utiliza indistintamente con el de célula hospedadora y se refiere a las células transfectadas, infectadas o transducidas de un tipo de célula deseado. En realizaciones preferentes, la célula diana es un linfocito T. La producción de partículas virales a gran escala suele ser necesaria para conseguir un título viral razonable. Las partículas virales se producen transfectando un vector de transferencia a una línea celular de empaquetamiento que comprende genes estructurales y/o accesorios virales, *por ej.*, genes gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpu, vpx o nef u otros genes retrovirales.

Tal como se utiliza aquí, el término "vector de empaquetamiento" se refiere a un vector de expresión o vector viral que carece de señal de empaquetamiento y que comprende un polinucleótido que codifica uno, dos, tres, cuatro o más genes virales estructurales y/o accesorios. Típicamente, los vectores de empaquetamiento están incluidos en una célula de empaquetamiento, y se introducen en la célula vía transfección, transducción o infección. Los métodos de transfección, transducción o infección son bien conocidos por los expertos en la materia. Un vector de transferencia retroviral/lentiviral de la presente revelación puede introducirse en una línea celular de empaquetamiento, mediante transfección, transducción o infección, para generar una célula o línea celular productora. Los vectores de empaquetamiento de la presente revelación pueden introducirse en células o líneas celulares humanas mediante métodos estándar que incluyen, *por ej.*, la transfección de fosfato de calcio, lipofección o electroporación. En algunos ejemplos, los vectores de empaquetamiento se introducen en las células junto con un marcador seleccionable dominante, como la neomicina, higromicina, puromicina, blastomicina, zeocina, timidina quinasa, DHFR, Gin sintetasa o ADA, seguidas de una selección en presencia del fármaco apropiado y aislamiento de los clones. Un gen marcador seleccionable puede enlazarse físicamente a los genes codificados por el vector de empaquetamiento, *por ej.*, por IRES o péptidos virales autoescindibles.

Las proteínas de envoltura viral (Env) determinan el margen de células hospedadoras que se pueden infectar y transformar en última instancia por retrovirus recombinantes generados a partir de las líneas celulares. En el caso de los lentivirus, como el VIH-1, HTV-2, SIV, FIV y EIV, las proteínas Env incluyen la gp41 y la gp120. Preferentemente, las proteínas Env virales expresadas por células de empaquetamiento de la presente revelación se codifican en un vector separado de los genes gag y pol virales, como se ha descrito anteriormente. Entre los ejemplos ilustrativos de genes de Env derivados de retrovirus que pueden emplearse en la presente revelación se incluyen, entre otros: envolturas de MLV, envoltura 10A1, BAEV, FeLV-B, RD114, SSAV, Ébola, Sendai, FPV (virus de la peste aviar), y envolturas de virus de la gripe. De manera similar, se pueden utilizar genes que codifican las envolturas de virus de ARN (*por ej.*, familias de virus de ARN de Picornaviridae, Calciviridae, Astroviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Reoviridae, Birnaviridae, Retroviridae), así como de los virus de ADN (familias de Hepadnaviridae, Circoviridae, Parvoviridae, Papovaviridae, Adenoviridae, Herpesviridae, Poxviridae, e Iridoviridae). Algunos ejemplos representativos son FeLV, VEE, HFVW, WDSV, SFV, Rabia, ALV, BIV, BLV, EBV, CAEV, SNV, ChTLV, STLV, MPMV, SMRV, RAV, FuSV, MH2, AEV, AMV, CT10, y EIAV.

En otros ejemplos, en las proteínas de envoltura para el pseudotipado de un virus de la presente revelación se incluyen entre otros, cualquiera de los siguientes virus: gripe A como H1N1, H1N2, H3N2 y H5N1 (gripe aviar), gripe B, virus de la gripe C, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D, virus de la hepatitis E, rotavirus, cualquier virus del grupo de virus de Norwalk, adenovirus entéricos, parvovirus, virus de la fiebre del dengue, la viruela de los simios, mononegavirus, los lisavirus como el virus de la rabia, el virus de los murciélagos de Lagos, el virus Mokola, el virus Duvenhage, los virus de los murciélagos europeos 1 y 2 y el virus de los murciélagos australianos, el Ephemerovirus, el vesiculovirus, el virus de la estomatitis vesicular (VSV), el herpesvirus como el virus del herpes simple tipos 1 y 2, el herpes zóster, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr (EBV), el herpesvirus humano (HHV), el herpesvirus humano tipo 6 y 8, el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el virus del papiloma humano, el gammaherpesvirus murino, los arenavirus como el virus de la fiebre hemorrágica argentina, el virus de la fiebre hemorrágica boliviana, el virus de la fiebre hemorrágica asociada a Sabiá, el virus de la fiebre hemorrágica venezolana, el virus de la fiebre de Lassa, el virus del Machupo, el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), los Bunyaviridae como el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, el hantavirus, el virus de la fiebre hemorrágica con síndrome renal, el virus de la fiebre del Valle del Rift, los Filoviridae (filovirus) incluidos el virus de la fiebre hemorrágica del Ébola y la fiebre hemorrágica de Marburgo, los Flaviviridae incluidos el virus de la enfermedad de la selva de Kyasanur, el virus de la fiebre hemorrágica de Omsk, el virus de la encefalitis por garrapatas y los Paramyxoviridae como el virus Hendra y el virus Nipah, la viruela y la viruela menor, los alfavirus como el virus de la encefalitis equina venezolana, el virus de la encefalitis equina oriental, el virus de la encefalitis equina occidental y el coronavirus asociado al SRAS (SARS-CoV), el virus del Nilo Occidental, cualquier virus causante de encefalitis.

En un ejemplo, la presente revelación proporciona células de empaquetamiento que producen retrovirus recombinantes, *por ej.*, lentivirus, pseudotipado con la glicoproteína VSV-G.

Los términos "pseudotipo" o "pseudotipado", tal como se utilizan aquí, se refieren a un virus cuyas proteínas de envoltura viral han sido sustituidas por las de otro virus que posee características preferibles. Por ejemplo, el VIH puede pseudotiparse con proteínas de la envoltura de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), lo que permite que el VIH infecte una gama más amplia de células porque las proteínas de la envoltura del VIH (codificadas por el gen de Env) normalmente dirigen el virus a las células que presentan CD4<sup>+</sup>. En una realización preferente de la invención, las proteínas de envoltura lentiviral son pseudotipadas con VSV-G. En un ejemplo, la revelación proporciona células de empaquetamiento que producen retrovirus recombinantes, *por ej.*, lentivirus, pseudotipados con la glicoproteína de envoltura VSV-G.

Tal como se utiliza aquí, el término "líneas celulares de empaquetamiento" se utiliza para referirse a las líneas celulares que no contienen una señal de empaquetamiento, pero que expresan de manera estable o transitoria proteínas estructurales y enzimas de replicación virales (*por ej.*, gag, pol y env) necesarias para el empaquetado correcto de las partículas virales. Puede emplearse cualquier línea celular adecuada para preparar las células de empaquetamiento de la presente revelación. Generalmente, las células son células de mamíferos. En un ejemplo en particular, las células utilizadas para producir la línea celular de empaquetamiento son células humanas. Las líneas celulares adecuadas que pueden utilizarse incluyen, *por ej.*, células CHO, células BHK, células MDCK, células C3H 10T1/2, células FLY, células Psi-2, células BOSC 23, células PA317, células WEHI, células COS, células BSC 1, células BSC 40, células BMT 10, células VERO, células W138, células MRC5, células A549, células HT1080, células 293, células 293T, células B-50, células 3T3, células NIH3T3, células HepG2, células Saos-2, células Huh7, células HeLa, células W163, células 211 y células 211A. En ejemplos preferentes, las células de empaquetamiento son células 293, células 293T o células A549. En otros ejemplos preferentes, las células son células A549.

Tal como se utiliza aquí, el término "línea celular productora" se refiere a una línea celular capaz de producir partículas retrovirales recombinantes, comprendiendo una línea celular de empaquetamiento y una construcción de vector de transferencia que comprende una señal de empaquetamiento. La producción de partículas virales infecciosas y soluciones de estirpe viral puede llevarse a cabo mediante técnicas convencionales. Los métodos de preparación de soluciones de estirpe viral son conocidos por los expertos en la técnica y se ilustran en, *por ej.*, Y. Soneoka *et al.* (1995) *Nucl. Acids Res.* 23:628-633, y N. R. Landau *et al.* (1992) *J. Virol.* 66:5110-5113. Las partículas virales infecciosas pueden obtenerse de las células de empaquetamiento mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, las partículas infecciosas pueden obtenerse por lisis celular, o la recogida del sobrenadante del cultivo celular, como se conoce en la técnica. Opcionalmente, las partículas virales obtenidas pueden purificarse si se desea. Las técnicas de purificación adecuadas son bien conocidas por los expertos en la materia.

La generación de un gen o genes u otra secuencia de polinucleótidos utilizando un vector retroviral o lentiviral por medio de una infección viral en lugar de una transfección se denomina "transducción". En un ejemplo, los vectores retrovirales son transducidos a una célula a través de la infección y la integración de provirus. En determinados ejemplos, una célula diana, *por ej.*, un linfocito T, está "transducida" si comprende un gen u otra secuencia de polinucleótidos suministrados a la célula por una infección utilizando un vector viral o retroviral. En ejemplos en particular, una célula transducida comprende uno o más genes u otras secuencias de polinucleótidos suministrados por un vector retroviral o lentiviral de su genoma celular.

En ejemplos en particular, se administran a un sujeto células hospedadoras transducidas con un vector viral de la presente revelación que expresa uno o más polipéptidos para tratar y/o prevenir una neoplasia de linfocitos B. Pueden encontrarse otros métodos relacionados con el uso de vectores virales en la terapia génica, que pueden utilizarse según determinados ejemplos de la presente revelación, en, *por ej.*, Kay, M. A. (1997) *Chest* 111(6 Supp.):138S-142S; Ferry, N. y Heard, J. M. (1998) *HUM. Gene Ther.* 9:1975-81; Shiratory, Y. *et al.* (1999) *Liver* 19:265-74; Oka, K. *et al.* (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11:179-86; Thule, P. M. y Liu, J. M. (2000) *Gene Ther.* 7:1744-52; Yang, N. S. (1992) *Crit. Rev. Biotechnol.* 12:335-56; Alt, M. (1995) *J. Hepatol.* 23:746-58; Brody, S. L. y Crystal, R. G. (1994) *Ann. NY. Acad. Sci.* 716:90-101; Strayer, D. S. (1999) *Expert Opin. Investig. Drugs* 8:2159-2172; Smith-Arica, J. R. y Bartlett, J. S. (2001) *Curr. Cardiol. Rep.* 3:43-49; y Lee, H. C. *et al.* (2000) *Nature* 408:483-8.

## G. Células modificadas genéticamente

La presente revelación contempla, en ejemplos particulares, células modificadas genéticamente para expresar los CARs contemplados aquí para el uso en el tratamiento de cánceres. Tal como se utiliza aquí, el término "modificado genéticamente" o "diseñado genéticamente" se refiere a la adición de material genético adicional en forma de ADN o ARN al material genético total de una célula. Los términos "células modificadas genéticamente", "células modificadas" y "células redirigidas" se utilizan indistintamente. Tal como se utiliza aquí, el término "terapia génica" se refiere a la introducción de

material genético adicional en forma de ADN o ARN en el material genético total de una célula que restaura, corrige o modifica la expresión de un gen, o con el propósito de expresar un polipéptido terapéutico, *por ej.*, un CAR.

5 En realizaciones particulares, los vectores que comprenden un promotor MND y que codifican CARs de la presente invención se introducen y expresan en células efectoras inmunes con el fin de redirigir su especificidad a un antígeno diana de interés. Una "célula efectora inmune" es cualquier célula del sistema inmunológico que tiene una o más funciones efectoras (*por ej.*, actividad de destrucción de células citotóxicas, secreción de citoquinas, inducción de ADCC y/o CDC).

10 Las células efectoras inmunes de la presente invención pueden ser autólogas/autogénicas ("auto") o no autólogas ("no auto", *por ej.*, alogénicas, singénicas o xenogénicas).

"Autólogas", como se usa en el presente documento, se refiere a las células del mismo sujeto.

15 "Alogénicas", como se utiliza aquí, se refiere a las células de la misma especie que difieren genéticamente de la célula en comparación.

"Singénicas", como se utiliza aquí, se refiere a las células de un sujeto diferente que son genéticamente idénticas a la célula en comparación.

20 "Xenogénicas", como se utiliza aquí, se refiere a las células de una especie diferente a la célula en comparación. En realizaciones preferentes, las células de esta invención son alogénicas.

25 Entre las células efectoras inmunes ilustrativas utilizadas con vectores que componen los CARs contemplados aquí se incluyen los linfocitos T. Los términos "célula T" o "linfocito T" son reconocidos por los expertos en la materia y pretenden incluir timocitos, linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros, linfocitos T en reposo o linfocitos T activados. Un linfocito T puede ser un linfocito T cooperador (Th), *por ej.*, un linfocito T cooperador 1 (Th1) o linfocito T cooperador 2 (Th2). El linfocito T puede ser linfocito T cooperador (HTL; linfocito T CD4<sup>+</sup>), un linfocito T citotóxico (CTL; linfocito T CD8<sup>+</sup>), un linfocito T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, un linfocito T CD4CD8<sup>+</sup>, o cualquier otro subconjunto de linfocitos T. Otras poblaciones ilustrativas de linfocitos T adecuadas para el uso en realizaciones particulares son, entre otras, linfocitos T naive (vírgenes) y linfocitos T de memoria.

35 Como comprenderá el experto en la materia, los vectores que comprenden un promotor MND y que codifican un CAR pueden introducirse en otras células que también pueden utilizarse como células efectoras inmunes. En particular, las células efectoras inmunes también incluyen células NK, células NKT, neutrófilos y macrófagos. En las células efectoras inmunes también se incluyen progenitores de células efectoras donde se puede inducir dichas células progenitoras para diferenciarse en células efectoras inmunes *in vivo* o *in vitro*. Así pues, en realizaciones particulares, una célula efectora inmune incluye progenitores de células efectoras inmunes, como células madre hematopoyéticas (HSC) contenidas en la población de células CD34<sup>+</sup> derivadas de la sangre de cordón umbilical, la médula ósea o la sangre periférica movilizada que, al ser administradas en un sujeto, se diferencian en células efectoras inmunes maduras, o que pueden inducirse *in vitro* para diferenciarse en células efectoras inmunes maduras. Tal como se utiliza aquí, las células efectoras inmunes diseñadas genéticamente para contener un vector que comprende un promotor MND y que codifica un CAR específico de antígeno pueden denominarse "células efectoras inmunes redirigidas específicas de antígeno".

45 El término "célula CD34<sup>+</sup>", tal y como se utiliza aquí, se refiere a una célula que expresa la proteína CD34 en su superficie celular. "CD34", tal como se utiliza aquí, se refiere a una glicoproteína de la superficie celular (*por ej.*, la proteína sialomucina) que a menudo actúa como factor de adhesión entre células y participa en la entrada de linfocitos T en los ganglios linfáticos. La población de células CD34<sup>+</sup> contiene células madre hematopoyéticas (HSC), que al ser administradas a un paciente se diferencian y contribuyen a todos los linajes hematopoyéticos, incluyendo linfocitos T, células NK, células NKT, neutrófilos y células del linaje de monocitos/macrófagos.

50 La presente revelación proporciona métodos para fabricar las células efectoras inmunes que expresan el CAR contemplado en este documento. En un ejemplo, el método comprende la transfección o transducción de células efectoras inmunes aisladas de un individuo de tal manera que las células efectoras inmunes expresen una o más CAR como se describe en este documento. En determinados ejemplos, las células efectoras inmunes se aíslan de un individuo y se modifican genéticamente sin más manipulación *in vitro*. Estas células pueden ser directamente readministradas al individuo. En ejemplos adicionales, las células efectoras inmunes se activan y estimulan primero para que proliferen *in vitro* antes de ser modificadas genéticamente para expresar un CAR. A este respecto, las células efectoras inmunes pueden cultivarse antes y/o después de ser modificadas genéticamente (*es decir*, transducidas o transfectadas para expresar un CAR contemplado en el presente documento).

60

- En ejemplos en particular, antes de la manipulación *in vitro* o de la modificación genética de las células efectoras inmunes aquí descritas, la fuente de las células se obtiene de un sujeto. En ejemplos en particular, las células efectoras inmunes modificadas por CAR comprenden linfocitos T. Los linfocitos T pueden obtenerse de varias fuentes, entre ellas, células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de los ganglios linfáticos, sangre del cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo, y tumores. En determinados ejemplos, los linfocitos T pueden obtenerse de una unidad de sangre extraída de un sujeto utilizando cualquier número de técnicas conocidas por el experto en la materia, como la sedimentación, *por ej.*, separación FICOLL™.
- En un ejemplo, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen por aféresis. El producto de la aféresis contiene típicamente linfocitos, incluyendo linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En un ejemplo, las células obtenidas por aféresis pueden lavarse para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un tampón o medio apropiado para su posterior procesamiento. Las células pueden lavarse con PBS o con otra solución adecuada que no contenga calcio, magnesio y la mayoría, si no todos, los cationes divalentes. Como apreciarían los expertos en la materia, puede efectuarse un paso de lavado por métodos conocidos en la técnica, como el uso de una centrífuga semiautomática de flujo transversal. Por ejemplo, el procesador de células Cobe 2991, el Baxter CytoMate, o similares. Después del lavado, las células pueden volver a suspenderse en una variedad de tampones biocompatibles u otra solución salina con o sin tampones. En determinados ejemplos, los componentes no deseables de la muestra de aféresis pueden eliminarse en el medio de cultivo celular directamente resuspendido.
- En determinados ejemplos, los linfocitos T se aíslan de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante el lisado de los glóbulos rojos y la disminución de los monocitos, por ejemplo, mediante la centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™. Una subpoblación específica de linfocitos T, que expresa uno o más de los siguientes marcadores: CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA, y CD45RO, puede aislarse aún más por técnicas de selección positiva o negativa. En un ejemplo, una subpoblación específica de linfocitos T, que expresan CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA y CD45RO se aísla aún más mediante técnicas de selección positiva o negativa. Por ejemplo, el enriquecimiento de una población de linfocitos T por selección negativa puede lograrse con una combinación de anticuerpos dirigidos a los marcadores de superficie exclusivos de las células seleccionadas negativamente. Un método para el uso según este documento es la clasificación y/o selección de células mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza una mezcla de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4<sup>+</sup> por selección negativa, una mezcla de anticuerpos monoclonales típicamente incluye anticuerpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8. La citometría de flujo y la clasificación celular también pueden utilizarse para aislar poblaciones celulares de interés para el uso en la presente invención.
- La PBMC puede modificarse genéticamente directamente con vectores que comprenden un promotor MND enlazado operativamente para expresar un polinucleótido que codifica un CAR contemplado en el presente documento. En determinados ejemplos, después del aislamiento de PBMC, se aíslan más los linfocitos T y en algunos ejemplos, tanto los linfocitos T citotóxicos como los cooperadores pueden clasificarse en subpoblaciones de linfocitos T naive, de memoria y efectoras, ya sea antes o después de la modificación y/o expansión genética.
- Las células CD8<sup>+</sup> pueden obtenerse utilizando métodos estándar. En algunos ejemplos, las células CD8<sup>+</sup> se clasifican además en células naive, de memoria central y efectoras mediante la identificación de los antígenos de superficie celular que se asocian con cada uno de esos tipos de células CD8<sup>+</sup>.
- En determinados ejemplos, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> naive se caracterizan por la expresión de marcadores fenotípicos de linfocitos T naive entre ellos CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 y CD45RA.
- En ejemplos en particular, los linfocitos T de memoria están presentes tanto en los subconjuntos CD62L<sup>+</sup> como en los CD62L<sup>-</sup> de los linfocitos de sangre periférica CD8<sup>+</sup>. Las PBMC se clasifican en fracciones CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y CD62L<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> después de tñirlas con anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L. En algunos ejemplos, la expresión de marcadores fenotípicos de linfocitos T de memoria central incluyen CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 y CD127 y son negativos para la grancima B. En algunos ejemplos, los linfocitos T de memoria central son linfocitos T CD45RO<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>.
- En algunos ejemplos, los linfocitos T efectoras son negativos para CD62L, CCR7, CD28 y CD127, y positivos para la grancima B y la perforina.
- En determinados ejemplos, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se clasifican en subpoblaciones. Por ejemplo, los linfocitos T cooperadores CD4<sup>+</sup> pueden clasificarse en linfocitos naive, de memoria central y efectoras identificando las poblaciones de células que tienen antígenos de superficie celular. Los linfocitos CD4<sup>+</sup> pueden obtenerse mediante métodos estándar. En algunos ejemplos, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> naive son linfocitos CD45RO<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>. En algunos ejemplos, los

linfocitos CD4<sup>+</sup> de memoria central son CD62L positivos y CD45RO positivos. En algunos ejemplos, los linfocitos CD4<sup>+</sup> efectores son CD62L y CD45RO negativos.

5 Las células efectoras inmunes, como los linfocitos T, pueden modificarse genéticamente tras su aislamiento mediante métodos conocidos, o las células efectoras inmunes pueden activarse y expandirse (o diferenciarse en el caso de los progenitores) *in vitro* antes de modificarse genéticamente. En un ejemplo particular, las células efectoras inmunes, como los linfocitos T, se modifican genéticamente con los receptores de antígenos quiméricos aquí contemplados (*por ej.*, transducidos con un vector viral que comprende un promotor MND y un ácido nucleico que codifica un CAR) y luego se activan y expanden *in vitro*. En varios ejemplos, los linfocitos T pueden activarse y expandirse antes o después de la modificación genética para expresar un CAR, utilizando métodos como los descritos, por ejemplo, en las patentes USA N° 6.352.694; 6.534.055; 6.905.680; 6.692.964; 5.858.358; 6.887.466; 6.905.681; 7, 144.575; 7.067.318; 7, 172.869; 7, 232.566; 7, 175.843; 5, 883.223; 6, 905.874; 6, 797.514; 6, 867.041; y la publicación de la solicitud de patente USA N° 20060121005.

15 Generalmente, los linfocitos T se expanden por contacto con una superficie que tiene adherido a ella un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3 TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de los linfocitos T. Las poblaciones de linfocitos T pueden estimularse mediante el contacto con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento de unión a antígeno de este, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o por contacto con un activador de la proteína quinasa C (*por ej.*, la briostatina) junto con un ionóforo de calcio. También se contempla la coestimulación de moléculas accesorias en la superficie de los linfocitos T.

20 En ejemplos particulares, las PBMC o los linfocitos T aislados entran en contacto con un estimulador y un coestimulador, como los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, generalmente unidos a una esfera u otra superficie, en un medio de cultivo con citoquinas apropiadas, como la IL-2, la IL-7 y/o la IL-15. Para estimular la proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Entre los ejemplos de anticuerpo anti-CD28 se incluyen 9,3, B-T3, XR-CD28 (Diacione, Besancon, Francia), y pueden utilizarse otros métodos comúnmente conocidos en la técnica (Berg *et al.*, Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen *et al.*, J. Exp. Med. 190(9): 13191328, 1999; Garland *et al.*, J. Immunol Meth. 227 (1-2):53-63, 1999). Los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a la misma esfera sirven como una célula presentadora de antígeno (APC) "sustituta". En otros ejemplos, los linfocitos T pueden activarse y estimularse para que proliferen con células alimentadoras y anticuerpos y citoquinas apropiados utilizando métodos como los descritos en US 6.040.177; US 5.827.642; y WO 2012129514.

25 En otros ejemplos, la APC artificial (aAPC) está hecha mediante el diseño de células K562, U937, 721.221, T2, y C1R para dirigir la expresión y secreción estables de una variedad de moléculas coestimuladoras y citoquinas. En un ejemplo particular, las aAPC K32 o U32 se utilizan para dirigir la visualización de una o más moléculas estimulantes basadas en anticuerpos en la superficie celular de la AAPC. La expresión de diversas combinaciones de genes en LA aAPC permite determinar con precisión los requisitos de activación de los linfocitos T humanos, de manera que las aAPC pueden adaptarse para la propagación óptima de subconjuntos de linfocitos T con requisitos de crecimiento específicos y funciones distintas. Las aAPC apoyan el crecimiento *ex vivo* y la expansión a largo plazo de los linfocitos T CD8 humanos funcionales sin necesidad de añadir citoquinas exógenas, en contraste con el uso de APC naturales. Las poblaciones de linfocitos T pueden expandirse mediante aAPCs que expresan una variedad de moléculas coestimuladoras, incluyendo entre otras, CD137L (4-1BBL), CD134L (OX40L), y/o CD80 o CD86. Por último, las aAPCs proporcionan una plataforma eficiente para expandir los linfocitos T genéticamente modificados y mantener la expresión de CD28 en los linfocitos T CD8. Las aAPCs se proporcionan en WO 03/057171 y US 2003/0147869 A1.

35 En un ejemplo, las células CD34<sup>+</sup> se transducen con una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la presente revelación. En determinados ejemplos, las células CD34<sup>+</sup> transducidas se diferencian en células efectoras inmunes maduras *in vivo* tras su administración a un sujeto, generalmente el sujeto del que se aislaron originalmente las células. En otro ejemplo, las células CD34<sup>+</sup> pueden estimularse *in vitro* antes de la revelación o después de modificarse genéticamente con un CAR como se describe en el presente documento, con una o más de las siguientes citoquinas: ligando Flt-3 (FLT3), factor de células madre (SCF), factor de crecimiento y diferenciación de megacariocitos (TPO), IL-3 e IL-6 según los métodos descritos anteriormente (Asheuer *et al.*, 2004; Imren, *et al.*, 2004).

40 La presente invención proporciona una población de células efectoras inmunes modificadas para el tratamiento del cáncer, las células efectoras inmunes modificadas que comprenden un CAR de la invención. Por ejemplo, una población de células efectoras inmunes modificadas se prepara a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de un paciente diagnosticado de neoplasia de linfocitos B tal como se describe aquí (donantes autólogos). Las PBMC forman una población heterogénea de linfocitos T que pueden ser CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, o CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

45 Las PBMC también pueden incluir otros linfocitos citotóxicos como las células NK o las células NKT. Un vector de expresión que comprende un promotor, *por ej.*, un promotor MND, y la secuencia de codificación de un CAR contemplado en este

documento puede introducirse en una población de linfocitos T, células NK o células NKT de donantes humanos. Los linfocitos T transducidos con éxito que llevan el vector de expresión pueden clasificarse usando citometría de flujo para aislar los linfocitos T CD3 positivos y luego propagarse más para aumentar el número de estos linfocitos T que expresan la proteína de CAR, además de la activación celular mediante anticuerpos anti-CD3 y/o anticuerpos anti-CD28 y IL-2 o cualquier otro método conocido en la técnica como se describe en otra parte del presente documento. Se utilizan procedimientos estándar para la criopreservación de linfocitos T que expresan la proteína de CAR para su almacenamiento y/o preparación para el uso en un sujeto humano. En un ejemplo, la transducción, el cultivo y/o la expansión *in vitro* de linfocitos T se realizan en ausencia de productos derivados de animales no humanos, como el suero de ternero fetal y el suero de bovino fetal. Dado que una población heterogénea de PBMC está modificada genéticamente, las células transducidas resultantes son una población heterogénea de células modificadas que comprenden un CAR diana específico de antígeno como se contempla aquí.

En un ejemplo adicional, se puede utilizar una mezcla de, *por ej.*, uno, dos, tres, cuatro, cinco o más vectores de expresión diferentes para modificar genéticamente una población de donantes de células efectoras inmunes donde cada vector codifica una proteína de receptor de antígenos quiméricos diferente, como se contempla aquí. Las células efectoras inmunes modificadas resultantes forman una población mixta de células modificadas, con una proporción de células modificadas que expresan más de una proteína de CAR diferente.

En un ejemplo, la presente revelación proporciona un método de almacenamiento de células efectoras inmunes modificadas genéticamente que expresan proteína de CAR murina, humana o humanizada, que comprende la criopreservación de las células efectoras inmunes para que las células sigan siendo viables al descongelarse. Una fracción de las células efectoras inmunes que expresan las proteínas de CAR puede criopreservarse por métodos conocidos en la técnica para proporcionar una fuente permanente de dichas células para el futuro tratamiento de pacientes con cáncer. Cuando sea necesario, las células efectoras inmunes transformadas criopreservadas pueden descongelarse, cultivarse y expandirse para obtener más células de este tipo.

Tal como se utiliza aquí, "criopreservación" se refiere a la preservación de células mediante el enfriamiento a temperaturas bajo cero, como (típicamente) 77 K o  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  (el punto de ebullición del nitrógeno líquido). Los crioprotectores se utilizan a menudo a temperaturas bajo cero para evitar que las células que se preservan se dañen debido a la congelación a bajas temperaturas o el calentamiento a temperatura ambiente. Los criopreservadores y las tasas óptimas de enfriamiento pueden proteger contra las lesiones celulares. Entre los crioprotectores que pueden utilizarse se incluyen entre otros, el dimetilsulfóxido (DMSO) (Lovelock y Bishop, *Nature*, 1959; 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, *Nature*, 1961; 190: 1204-1205), glicerol, polivinilpirrolidona (Rinfret, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1960; 85: 576), y el polietilenglicol (Sloviter y Ravdin, *Nature*, 1962; 196: 48). La velocidad de enfriamiento preferida es de  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ . Después de al menos dos horas, los linfocitos T han alcanzado una temperatura de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y pueden colocarse directamente en nitrógeno líquido ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para su almacenamiento permanente, como en un recipiente de almacenamiento criogénico a largo plazo.

## H. Composiciones y formulaciones

Las composiciones contempladas en el presente documento pueden comprender uno o más polipéptidos, polinucleótidos, vectores que comprenden lo mismo, células efectoras inmunes modificadas genéticamente, *etc.*, como se contempla aquí. En las composiciones se incluyen, entre otras, las composiciones farmacéuticas. Por "composición farmacéutica" se entiende una composición formulada en soluciones farmacéutica o fisiológicamente aceptables para su administración a una célula o un animal, ya sea por sí sola o en combinación con una o más modalidades de tratamiento. También se entenderá que, si se desea, las composiciones de la presente invención pueden administrarse en combinación con otros agentes también, tales como, *por ej.*, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, moléculas pequeñas, quimioterápicos, profármacos, fármacos, anticuerpos, u otros agentes activos farmacéuticos. Prácticamente no hay límite para otros componentes que también pueden incluirse en las composiciones, siempre que los agentes adicionales no afecten negativamente a la capacidad de la composición para administrar el tratamiento previsto.

La frase "aceptable farmacéuticamente" se emplea aquí para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del ámbito de un juicio médico sensato, adecuados para el uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin una toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación excesiva, en proporción a una relación riesgo/beneficio razonable.

Tal como se utiliza aquí, "portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye entre otros, cualquier adyuvante, portador, excipiente, deslizante, edulcorante, diluyente, conservante, colorante/tinte, potenciador del sabor, tensioactivo, humectante, dispersante, agente de suspensión, estabilizador, agente isotónico, disolvente, surfactante, o emulsionante que haya sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos como aceptable para el uso en seres humanos o animales domésticos. Entre los portadores farmacéuticamente aceptables ejemplares se incluyen entre otros, los azúcares, como la lactosa, la glucosa y la sacarosa; los almidones, como el almidón

- de maíz y la fécula de patata; la celulosa y sus derivados, como la carboximetilcelulosa sódica, la etilcelulosa y el acetato de celulosa; la goma tragacanto; la malta; la gelatina; el talco; la manteca de cacao, las ceras, las grasas animales y vegetales, las parafinas, las siliconas, las bentonitas, el ácido silícico y el óxido de zinc; los aceites, como el aceite de cacahuete, el aceite de algodón, el aceite de cártamo, el aceite de sésamo, el aceite de oliva, el aceite de maíz y el aceite
- 5 de soja; los glicoles, como el propilenglicol; los polioles, como el glicerol, el sorbitol, el manitol y el polietilenglicol; los ésteres, como el oleato de etilo y el laurato de etilo; agar; agentes tampón, como el hidróxido de magnesio y el hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua sin pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones tampón de fosfato; y cualquier otra sustancia compatible empleada en formulaciones farmacéuticas.
- 10 En realizaciones particulares, las composiciones de la presente invención comprenden una cantidad de células efectoras inmunes modificadas genéticamente de la invención. Tal como se utiliza aquí, el término "cantidad" se refiere a "una cantidad eficiente" o "una cantidad efectiva" de una célula terapéutica modificada genéticamente, *por ej.*, linfocito T, para lograr un resultado profiláctico o terapéutico beneficioso o deseado, incluyendo los resultados clínicos.
- 15 Una "cantidad eficaz profilácticamente" se refiere a una cantidad de una célula terapéutica modificada genéticamente eficaz para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, aunque no necesariamente, dado que se utiliza una dosis profiláctica en sujetos que se encuentran en una etapa anterior o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad eficaz profilácticamente es menor que la cantidad eficaz terapéuticamente.
- 20 La "cantidad eficaz terapéuticamente" de una célula terapéutica modificada genéticamente puede variar según factores como la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de las células madre y progenitoras para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz terapéuticamente es también aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del virus o de las células terapéuticas transducidas es superado por los efectos terapéuticos beneficiosos. La expresión "cantidad eficaz terapéuticamente" incluye una cantidad que es eficaz para "tratar"
- 25 a un sujeto (*por ej.*, un paciente). Cuando se indica una cantidad terapéutica, la cantidad precisa de las composiciones de la presente invención a administrar puede ser determinada por un médico teniendo en cuenta las diferencias individuales de edad, peso, tamaño del tumor, grado de infección o metástasis y estado del paciente (sujeto). En general, puede afirmarse que una composición farmacéutica que comprende los linfocitos T aquí descritos puede administrarse en una dosis de  $10^2$  a  $10^{10}$  células/kg de peso corporal, preferentemente de  $10^5$  a  $10^6$  células/kg de peso corporal, incluyendo
- 30 todos los valores enteros dentro de esos márgenes. El número de células dependerá del uso final al que se destine la composición, así como del tipo de células que se incluyan en ella. Para los usos previstos en el presente documento, las células se encuentran generalmente en un volumen de un litro o menos, pueden ser de 500 mL o menos, incluso de 250 mL o 100 mL o menos. Por lo tanto, la densidad de las células deseadas es típicamente mayor de  $10^6$  células/mL y generalmente es mayor de  $10^7$  células/mL, generalmente  $10^8$  células/mL o más. El número clínicamente relevante de células inmunes puede repartirse en varias infusiones que acumulativamente igualan o exceden las  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ , o  $10^{12}$  células. En algunos ejemplos, en particular porque todas las células infundidas se redirigirán a un antígeno diana determinado (*por ej.*, cadena ligera  $\kappa$  o  $\lambda$ ), se podrá administrar un número menor de células, en el margen de  $10^6$ /kilogramo ( $10^6$ - $10^{11}$  por paciente). Las composiciones de células que expresan CAR pueden administrarse varias veces en dosis dentro de estos márgenes. Las células pueden ser alogénicas, singénicas, xenogénicas o autólogas para
- 40 el paciente que se somete al tratamiento. Si se desea, el tratamiento también puede incluir la administración de mitógenos (*por ej.*, PHA) o linfoquinas, citoquinas y/o quimioquina (*por ej.*, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, TNF-alfa, IL-18 y TNF-beta, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 $\alpha$ , etc.) tal como se describe aquí para mejorar la inducción de la respuesta inmunitaria.
- 45 Generalmente, las composiciones que comprenden las células activadas y expandidas como se describen aquí pueden utilizarse en el tratamiento y prevención de enfermedades que aparecen en individuos inmunodeprimidos. En particular, las composiciones que comprenden linfocitos T modificados por CAR contemplados en el presente documento se utilizan en el tratamiento del cáncer. Los linfocitos T modificados por CAR de la presente invención pueden administrarse solos o como composición farmacéutica en combinación con portadores, diluyentes, excipientes y/o con otros componentes tales como IL-2 u otras citoquinas o poblaciones celulares. En realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas
- 50 contempladas aquí comprenden una cantidad de linfocitos T modificados genéticamente, en combinación con uno o más portadores, diluyentes o excipientes aceptables farmacéutica o fisiológicamente.
- Las composiciones farmacéuticas de la presente invención que comprenden una población de células efectoras inmunes que expresan CAR, como los linfocitos T, pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra,
- 55 solución salina tamponada de fosfato y similares; carbohidratos como la glucosa, la manosa, la sacarosa o el dextrano, el manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos como la glicina; antioxidantes; quelantes como el EDTA o el glutatión; adyuvantes (*por ej.*, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente invención están formuladas preferentemente para su administración parenteral, *por ej.*, administración intravascular (intravenosa o intraarterial), intraperitoneal o intramuscular.

60

Las composiciones farmacéuticas líquidas, ya sean soluciones, suspensiones u otras formas similares, pueden incluir uno o más de lo siguiente: diluyentes estériles como agua para inyección, solución salina, preferentemente salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir de disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerol, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos como el alcohol bencílico o el metilparabeno; antioxidantes como el ácido ascórbico o el bisulfito de sodio; quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético; tampones como acetatos, citratos o fosfatos y agentes de ajuste de tonicidad como el cloruro de sodio o la dextrosa. La preparación parenteral puede encapsularse en ampollas, jeringas desechables o frascos multidosis de vidrio o plástico. Una composición farmacéutica inyectable es preferentemente estéril.

En una realización particular, las composiciones contempladas aquí comprenden una cantidad eficaz de células efectoras inmunes que expresan CAR, solas o en combinación con uno o más agentes terapéuticos. Por lo tanto, las composiciones de células efectoras inmunes que expresan CAR pueden administrarse solas o en combinación con otros tratamientos conocidos contra el cáncer, como la radioterapia, la quimioterapia, el trasplante, la inmunoterapia, la terapia hormonal, la terapia fotodinámica, *etc.* Las composiciones también pueden administrarse en combinación con antibióticos. Dichos agentes terapéuticos pueden ser aceptados en la técnica como un tratamiento estándar para una enfermedad en particular como se describe en este documento, como un cáncer en particular. Entre los agentes terapéuticos ejemplares contemplados figuran las citoquinas, factores de crecimiento, esteroides, AINE, los FARME, antiinflamatorios, quimioterápicos, radioterapéuticos, anticuerpos terapéuticos, u otros agentes activos y auxiliares.

En determinadas realizaciones, las composiciones que comprenden células efectoras inmunes que expresan CAR reveladas en el presente documento pueden administrarse junto con cualquier número de agentes quimioterápicos. Entre los ejemplos ilustrativos de agentes quimioterapéuticos figuran agentes alquilantes como la tiotepa y la ciclofosfamida (CYTOXAN™); alquilsulfonatos como el busulfán, el improsulfán y el piposulfán; aziridinas como la benzodopa, el carbocouona, la meturedopa y la uredopa; etileniminas y metilamelaminas como la altretamina, la trietilenemelamina, la trietilenfosforamida, la trietilenetiofosforamida y la trimetilolomelamina; mostazas nitrogenadas como clorambucilo, clornafacina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorubicina, estreptomycin, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos como el metotrexato y el 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico como la denopterina, el metotrexato, la pteropterina, el trimetrexato; análogos de la purina como la fludarabina, la 6-mercaptopurina, la tiampirina, la tioguanina; análogos de la pirimidina como la ancitabina, la azacitidina, la 6-azauridina, el carmofur, la citarabina, la dideoxiuridina, la doxifluridina, la enocitabina, la floxuridina y el 5FU; andrógenos como la calusterona, el propionato de dromostanolona, el epitioestanol, el mepitioestano y la testolactona; antiadrenales como la aminoglutetimida, el mitotano y el trilostano; reponedor de ácido fólico, como el ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicon; eflormitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidamina; mitoguzona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofílico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuzónico; triazicuona; 2, 2', 2"-trichlorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; citarabina ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ej., paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucil; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos del platino como el cisplatino y el carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; teniposida; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DFMO); derivados del ácido retinoico como Targretin™ (bexaroteno), Panretin™ (alitretinoína); ONTAK™ (Denileukin diftitox); esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados aceptables farmacéuticamente de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en los tumores, como los antiestrógenos, incluyendo por ejemplo, el tamoxifeno, raloxifeno, inhibidores de aromatasa 4(5)-imidazoles, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos como la flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados aceptables farmacéuticamente de cualquiera de los anteriores.

Puede utilizarse una variedad de otros agentes terapéuticos en conjunto con las composiciones aquí descritas. En una realización, la composición que comprende células efectoras inmunes que expresan CAR se administra con un antiinflamatorio. En los fármacos o agentes antiinflamatorios se incluyen entre otros, los esteroides y los glucocorticoides (entre ellos, ibetametasona, budesonida, dexametasona, acetato de hidrocortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona y triamcinolona), los antiinflamatorios no esteroides (AINE), incluyendo aspirina, ibuprofeno, naproxeno, metotrexato, sulfasalazina, leflunomida, medicamentos anti-FNT, ciclofosfamida y micofenolato.

Otros AINE ejemplares se eligen del grupo formado por ibuprofeno, naproxeno, naproxeno sódico, inhibidores de la Cox-2 tales como el VIOXX® (rofecoxib) y el CELEBREX® (celecoxib), y los sialilatos. Los analgésicos ejemplares se escogen del grupo formado por paracetamol, oxicodona y tramadol de clorhidrato de propoxifeno. Los glucocorticoides ejemplares se eligen del grupo formado por cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona o prednisona. En los modificadores de respuesta biológica ejemplares se incluyen las moléculas dirigidas contra los marcadores de superficie celular (*por ej.*, CD4, CD5, *etc.*), los inhibidores de citoquinas, como los antagonistas del TNF (*por ej.*, etanercept (ENBREL®), adalimumab (HUMIRA®) e infliximab (REMICADE®), los inhibidores de quimioquina y los inhibidores de moléculas de adhesión. En los modificadores de respuesta biológica se incluyen anticuerpos monoclonales así como formas recombinantes de moléculas. En los FARME ejemplares se incluyen la azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina, metotrexato, penicilamina, leflunomida, sulfasalazina, hidroxiclороquina, oro (oral (auranofina) e intramuscular) y minociclina.

En los ejemplos ilustrativos de anticuerpos terapéuticos aptos para su combinación con linfocitos T modificados por CAR contemplados en el presente documento se incluyen entre otros, abagovomab, adecatumumab, afutuzumab, alemtuzumab, altumomab, amatuximab, anatomomab, arcitumomab, bavituximab, bectumomab, bevacizumab, bivatuzumab, blinatumomab, brentuximab, cantuzumab, catumaxomab, cetuximab, citatuzumab, cixutumumab, clivatuzumab, conatumumab, daratumumab, drozitumab, duligotumab, dusigitumab, detumomab, dacetuzumab, dalotuzumab, ecomeximab, elotuzumab, ensituximab, ertumaxomab, etaracizumab, farietuzumab, ficlatuzumab, figitumumab, flanvotumab, futuximab, ganitumab, gemtuzumab, girentuximab, glembatumumab, ibritumomab, igovomab, imgatuzumab, indatuximab, inotuzumab, intetumumab, ipilimumab, iratumumab, labetuzumab, lextatumumab, lintuzumab, lorvotuzumab, lucatumumab, mapatumumab, matuzumab, milatumumab, minretumomab, mitumomab, moxetumomab, narnatumab, naptumomab, necitumumab, nimotuzumab, nofetumomab, ofatumumab, ocaratuzumab, olaratumab, onartuzumab, oportuzumab, oregovomab, panitumumab, parsatuzumab, patritumab, pentumomab, pertuzumab, pintumomab, primumab, racotumomab, radretumab, rilotumumab, rituximab, robatumumab, satumomab, sibrotuzumab, siltuximab, simtuzumab, solitomab, tacatumumab, taplitumomab, tenatumomab, teprotumumab, tigatuzumab, tositumomab, trastuzumab, tucotuzumab, ublituximab, veltuzumab, vorsetuzumab, votumumab, zalutumumab, CC49 y 3F8.

En determinadas realizaciones, las composiciones aquí descritas se administran en conjunción con una citoquina. Por "citoquina", tal como se utiliza en este documento, se entiende un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Algunos ejemplos de estas citoquinas son las linfoquinas, monoquinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen las hormonas del crecimiento como la hormona de crecimiento humano, la hormona de crecimiento humano N-metionil y la hormona de crecimiento bovino; la hormona paratiroidea; la tiroxina; la insulina; la proinsulina; la relaxina; la pro-relaxina; hormonas glicoprotéicas como la hormona folículo estimulante (FSH), la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia antimulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso como el NGF-beta; factor de crecimiento derivado de las plaquetas; factores de crecimiento transformante (TGF) como el TGF-alfa y el TGF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones como el interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF) como el macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (IL) como IL-1, IL-1 alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, un factor de necrosis tumoral como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores polipeptídicos como LIF y ligando kit (KL). Tal como se utiliza aquí, el término "citoquina" incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos celulares recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

## I. Células y antígenos diana

La presente invención contempla, en parte, células efectoras inmunes modificadas genéticamente redirigidas a una célula diana, *por ej.*, un tumor o una célula cancerosa, y que comprenden CARs que tienen un dominio de unión que se une a antígenos diana de las células. Tal como se utiliza en este documento, el término "cáncer" se refiere generalmente a una clase de enfermedades o afecciones en las que las células anormales se dividen sin control y pueden invadir los tejidos cercanos. Las células cancerosas también pueden propagarse a otras partes del cuerpo a través de la sangre y los sistemas linfáticos. Hay varios tipos principales de cáncer. El carcinoma es un cáncer que se inicia en la piel o en los tejidos que recubren o cubren los órganos internos. El sarcoma es un cáncer que se inicia en el hueso, cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido conectivo o de apoyo. La leucemia es un cáncer que se inicia en el tejido que forma la sangre, como la médula ósea, y hace que se produzcan grandes cantidades de células sanguíneas anormales que entran en la sangre. El linfoma y el mieloma múltiple son cánceres que se inician en las células del sistema inmunológico. Los cánceres del sistema nervioso central son cánceres que se inician en los tejidos del cerebro y la médula espinal.

5 Tal como se utiliza aquí, el término "maligno" se refiere a un cáncer en el que un grupo de células tumorales presenta un crecimiento o más incontrolado (*es decir*, división más allá de los límites normales), invasión (*es decir*, intrusión y destrucción de tejidos adyacentes) y metástasis (*es decir*, propagación a otros lugares del cuerpo a través de la linfa o la sangre). Tal como se utiliza en este documento, el término "metástasis" se refiere a la propagación del cáncer de una parte del cuerpo a otra. Un tumor formado por células que se han programado se llama "tumor metastásico" o "metástasis". El tumor metastásico contiene células que son como las del tumor original (primario).

10 Tal como se utiliza aquí, el término "benigno" o "no maligno" se refiere a los tumores que pueden crecer pero que no se propagan a otras partes del cuerpo. Los tumores benignos son autolimitados y típicamente no invaden o metastatizan.

15 Una "célula cancerosa" o "célula tumoral" se refiere a una célula individual de un crecimiento o tejido canceroso. Un tumor se refiere generalmente a una hinchazón o lesión formada por un crecimiento anormal de células, que puede ser benigno, precanceroso o maligno. La mayoría de los cánceres forman tumores, pero algunos, *por ej.*, la leucemia, no necesariamente forman tumores. Para aquellos cánceres que forman tumores, los términos (célula) cancerosa y (célula) tumoral se usan indistintamente. La cantidad de un tumor en un individuo es la "masa tumoral" que puede medirse como el número, volumen o peso del tumor.

20 En una realización, la célula diana expresa un antígeno, *por ej.*, un antígeno diana, que no se encuentra sustancialmente en la superficie de otras células normales (deseadas). En una realización, la célula diana es una célula parenquimatosa pancreática, célula del conducto pancreático, célula hepática, cardiomiocito, miocito, osteoblasto, mioblasto esquelético, neurona, célula endotelial vascular, célula pigmentaria, célula muscular lisa, neuroglíocito, adipocito, osteocito, condrocito, célula de islote de Langerhans, célula del SNC, célula del SNP, hepatocito, célula adiposa, célula renal, célula pulmonar, célula cutánea, célula ovárica, célula folicular, célula epitelial, célula inmune o una célula endotelial.

25 En determinadas realizaciones, la célula diana forma parte de un tejido pancreático, tejido neural, tejido cardíaco, médula ósea, tejido muscular, tejido óseo, tejido cutáneo, tejido hepático, folículos pilosos, tejido vascular, tejido adiposo, tejido pulmonar y tejido renal.

30 En una realización en particular, la célula diana es una célula tumoral. En otra realización en particular, la célula diana es una célula cancerosa, como la de un paciente con cáncer. En las células ejemplares que pueden matarse con los métodos revelados se incluyen células de los siguientes tumores: un tumor líquido como la leucemia, incluyendo la leucemia aguda (como la leucemia linfocítica aguda, la leucemia mielocítica aguda y la mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y la eritroleucemia), leucemias crónicas (como la leucemia mielocítica (granulocítica) crónica y la leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada).

40 En otra realización, la célula es una célula tumoral sólida, como los sarcomas y carcinomas, el fibrosarcoma, el mixosarcoma, el liposarcoma, el condrosarcoma, el sarcoma osteogénico y otros sarcomas, el sinovioma, el mesotelioma, el tumor de Ewing, el leiomiomasarcoma, el rhabdomyosarcoma y el carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma (*por ej.*, adenocarcinoma de páncreas, colon, ovario, pulmón, mama, estómago, próstata, cuello uterino o esófago), carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de vías biliares, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor de testículos, carcinoma de vejiga, tumores del SNC (como un glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringoglioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma).

50 En una realización, el cáncer se selecciona del grupo formado por: un tumor de Wilms, un sarcoma de Ewing, un tumor neuroendocrino, un glioblastoma, un neuroblastoma, un melanoma, un cáncer de piel, un cáncer de mama, un cáncer de colon, un cáncer de recto, un cáncer de próstata, un cáncer de hígado, un cáncer de riñón, un cáncer de páncreas, un cáncer de pulmón, un cáncer biliar, un cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma medular de tiroides, cáncer de ovario, glioma, linfoma, leucemia, mieloma, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano y cáncer de vejiga urinaria.

60 En una realización, la célula diana es una célula maligna del hígado, el páncreas, el pulmón, la mama, la vejiga, el cerebro, el hueso, la tiroides, el riñón, la piel y el sistema hematopoyético. En otra realización, la célula diana es una célula de un cáncer de hígado, de páncreas, de pulmón, de mama, de vejiga, de cerebro, de hueso, de tiroides, de riñón, de piel o hematológico.

En una realización, el antígeno diana es un epítipo de un receptor folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha_2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, o un polipéptido VEGFR2.

## 10 J. Métodos terapéuticos

Los linfocitos T modificados genéticamente que se contemplan aquí proporcionan métodos mejorados de inmunoterapia adoptiva para el uso en el tratamiento de diversos tumores y cánceres. En realizaciones particulares, la especificidad de un linfocito T primario se redirige a las células tumorales o cancerosas mediante la modificación genética del linfocito T primario con un CAR contemplado en este documento. En varios ejemplos, se utiliza un vector viral para modificar genéticamente una célula efectora inmune con un polinucleótido que comprende un promotor MND y que codifica un CAR que comprende un dominio de unión específica a antígeno que se une a un receptor de folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha_2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, o un polipéptido VEGFR2; un dominio bisagra; un dominio transmembrana que comprende un dominio TM derivado de un polipéptido seleccionado del grupo formado por: CD8 $\alpha$ ; CD4, CD45, PD1, y CD152, y un enlace corto de oligopéptido o polipéptido, preferentemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos de longitud que conecta el dominio TM con el dominio de señalización intracelular del CAR; y uno o más dominios de señalización coestimuladores intracelulares seleccionados del grupo formado por: CD28, CD134 y CD137; y un dominio de señalización primario de CD3C.

En un ejemplo, la presente revelación incluye un tipo de terapia celular en la que los linfocitos T se modifican genéticamente para expresar un CAR que se dirige a las células cancerosas que expresan un antígeno diana, y el linfocito T CAR se infunde a un receptor que lo necesita. La célula infundida es capaz de matar las células tumorales del receptor. A diferencia de las terapias de anticuerpos, los linfocitos T CAR son capaces de replicarse *in vivo*, lo que resulta en una persistencia a largo plazo que puede conducir a un tratamiento mantenido del cáncer.

En un ejemplo, los linfocitos T CAR de la presente invención pueden experimentar una robusta expansión de los linfocitos T *in vivo* y pueden persistir durante un largo período de tiempo. En otro ejemplo, los linfocitos T CAR de esta invención evolucionan en linfocitos T de memoria específicos que pueden reactivarse para inhibir cualquier formación o crecimiento adicional de un tumor.

En ejemplos particulares, las composiciones que comprenden una célula efectora inmune modificada genéticamente con un vector que comprende un promotor MND enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un CAR se utilizan en el tratamiento de tumores o cánceres sólidos, incluyendo entre otros, cáncer de hígado, de páncreas, de pulmón, de mama, de vejiga, de cerebro, de huesos, de tiroides, de riñón o de piel.

En ejemplos en particular, en el tratamiento del cáncer de páncreas se utilizan composiciones que comprenden una célula efectora inmune modificada genéticamente con un vector que comprende un promotor MND enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un CAR que comprende un dominio de unión específica a antígeno que se une a un epítipo de PSCA o MUC1.

En ejemplos particulares, en el tratamiento de un glioblastoma multiforme se utilizan composiciones que comprenden una célula efectora inmune modificada genéticamente con un vector que comprende un promotor MND enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un CAR que comprende un dominio de unión específica a antígeno que se une a un epítipo de EPHA2, EGFRvIII, o CSPG4.

En ejemplos particulares, en el tratamiento del cáncer de vejiga se utilizan composiciones que comprenden una célula efectora inmune modificada genéticamente con un vector que comprende un promotor MND enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un CAR que comprende un dominio de unión específica a antígeno que se une a un epítipo de PSCA o MUC1.

En ejemplos en particular, en el tratamiento del cáncer de pulmón se utilizan composiciones que comprenden una célula efectora inmune modificada genéticamente con un vector que comprende un promotor MND enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un CAR que comprende un dominio de unión específica a antígeno que se une a un epítipo de PSCA o GD2.

5 En ejemplos particulares, en el tratamiento del cáncer de mama, *por ej.*, cáncer de mama triple negativo, se utilizan composiciones que comprenden una célula efectora inmune modificada genéticamente con un vector que comprende un promotor MND enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un CAR que comprende un dominio de unión específica a antígeno que se une a un epítipo de CSPG4 o HER2.

10 En ejemplos particulares, en el tratamiento del melanoma se utilizan composiciones que comprenden una célula efectora inmune modificada genéticamente con un vector que comprende un promotor MND enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un CAR que comprende un dominio de unión específica a antígeno que se une a un epítipo de GD2 o CSPG4.

15 En ejemplos particulares, se utilizan composiciones que comprenden una célula efectora inmune modificada genéticamente con un vector que comprende un promotor MND enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un CAR para el tratamiento de tumores líquidos, entre los que se encuentra la leucemia, incluyendo leucemia aguda (*por ej.*, ALL, AML y mieloblastos, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (*por ej.*, CLL, SLL, CML, HCL), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y enfermedad de cadena pesada.

20 En ejemplos particulares, se utilizan composiciones que comprenden una célula efectora inmune modificada genéticamente con un vector que comprende un promotor MND enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un CAR para el tratamiento de los tumores malignos de linfocitos B, incluyendo entre otros, mieloma múltiple (MM), linfoma no hodgkiniano (NHL) y leucemia linfocítica crónica (CLL).

30 El mieloma múltiple es un tumor maligno de linfocitos B de morfología de células plasmáticas maduras caracterizado por la transformación neoplásica de un solo clon de este tipo de células. Estas células plasmáticas proliferan en la BM y pueden invadir el hueso adyacente y a veces la sangre. Entre las formas variantes de mieloma múltiple se incluyen el mieloma múltiple sintomático, el mieloma múltiple latente, la leucemia de células plasmáticas, el mieloma no secretor, el mieloma IgD, el mieloma osteosclerótico, el plasmacitoma solitario de hueso y el plasmacitoma extramedular (ver, *por ej.*, Braunwald, *et al.* (eds), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15.<sup>a</sup> edición (McGraw-Hill 2001)).

35 El linfoma no hodgkiniano abarca un gran grupo de cánceres de linfocitos (glóbulos blancos). Los linfomas no hodgkinianos pueden aparecer a cualquier edad y suelen estar marcados por nódulos linfáticos más grandes de lo normal, fiebre y pérdida de peso. Hay muchos tipos diferentes de linfoma no hodgkiniano. Por ejemplo, el linfoma no hodgkiniano puede dividirse en los tipos agresivo (de crecimiento rápido) e indolente (de crecimiento lento). Aunque los linfomas no hodgkinianos pueden derivarse de los linfocitos B y los linfocitos T, tal como se utilizan en el presente documento, los términos "linfoma no hodgkiniano" y "linfoma no hodgkiniano de linfocitos B" se utilizan indistintamente. En los linfomas no hodgkinianos de linfocitos B se incluyen el linfoma de Burkitt, leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño (CLL/SLL), linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma folicular, linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico precursor de linfocitos B y linfoma de células del manto. Los linfomas que se producen después de un trasplante de médula ósea o de células madre suelen ser linfomas no hodgkinianos de linfocitos B.

45 La leucemia linfocítica crónica (CLL) es un cáncer indolente (de crecimiento lento) que causa un lento aumento de los glóbulos blancos inmaduros llamados linfocitos B, o células B. Las células cancerosas se propagan a través de la sangre y la médula ósea, y también pueden afectar a los ganglios linfáticos u otros órganos como el hígado y el bazo. La CLL causa a la larga que la médula ósea falle. A veces, en etapas avanzadas de la enfermedad, la enfermedad se llama linfoma linfocítico pequeño.

50 En ejemplos particulares, se proporcionan métodos que comprenden la administración de una cantidad eficaz terapéuticamente de células efectoras inmunes que expresan CAR contempladas en el presente documento o una composición que comprende lo mismo, a un paciente que la necesite, sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos. En determinadas realizaciones, las células de la invención se utilizan para el tratamiento de pacientes con riesgo de desarrollar un cáncer. Así pues, la presente revelación proporciona métodos para el tratamiento o la prevención de un cáncer que comprenden la administración a un sujeto que lo necesite, de una cantidad eficaz terapéuticamente de linfocitos T modificados por CAR de la invención.

60 Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "individuo" y "sujeto" se utilizan a menudo indistintamente y se refieren a cualquier animal que presente un síntoma de cáncer que pueda tratarse con los vectores de la terapia génica, los tratamientos terapéuticos celulares y los métodos revelados en otras partes del presente documento. Entre los sujetos

adecuados (*por ej.*, los pacientes) se incluyen los animales de laboratorio (como ratones, ratas, conejos o conejillos de indias), los animales de granja y los animales domésticos o mascotas (como gatos o perros). Se incluyen los primates no humanos y, preferentemente, los pacientes humanos. En los sujetos típicos se incluyen pacientes humanos que tienen cáncer, han sido diagnosticados de cáncer, o están en riesgo de padecer un cáncer.

5 Tal como se utiliza aquí, el término "paciente" se refiere a un sujeto al que se le ha diagnosticado un cáncer en particular que puede tratarse con los vectores de terapia génica, tratamientos terapéuticos celulares y métodos revelados en otras partes del presente documento.

10 Tal como se usa aquí, el término "tratamiento" o "que trata," incluye cualquier efecto beneficioso o deseable en los síntomas o la patología de una enfermedad o afección patológica, y puede incluir incluso reducciones mínimas de uno o más marcadores mensurables de la enfermedad o afección que se está tratando, *por ej.*, el cáncer. El tratamiento puede consistir, opcionalmente, en la reducción o la mejora de los síntomas de la enfermedad o afección, o en el retraso de la progresión de la enfermedad o afección. El "tratamiento" no indica necesariamente la erradicación o cura completa de la enfermedad o afección, o de los síntomas asociados a ella.

15 Tal como se utiliza aquí, "prevenir" y palabras similares como "prevenido", "que previene", *etc.*, indican un enfoque para prevenir, inhibir o reducir la probabilidad de que ocurra o reaparezca una enfermedad o afección, *por ej.*, cáncer. También se refiere a retrasar el inicio o la reaparición de una enfermedad o afección o retrasar la aparición o la reaparición de los síntomas de una enfermedad o afección. Tal como se utiliza aquí, en "prevención" y otras palabras similares también se incluyen la reducción de la intensidad, el efecto, los síntomas y/o la carga de una enfermedad o afección antes de su aparición o reaparición.

20 Por "mejorar" o "promover", o "aumentar" o "ampliar" se entiende en general la capacidad de una composición contemplada en el presente documento, *por ej.*, un linfocito T modificado genéticamente o un vector que codifica un CAR, para producir, provocar o causar una mayor respuesta fisiológica (*es decir*, efectos posteriores) en comparación con la respuesta causada por un vehículo o una molécula/composición de control. Una respuesta fisiológica mensurable puede incluir un aumento de la expansión, activación y persistencia de los linfocitos T y/o un aumento de la capacidad de matar las células cancerosas, entre otras cosas, según se desprende del conocimiento de la técnica y de la descripción ofrecida en el presente documento. Una cantidad "aumentada" o "mejorada" es típicamente una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir un aumento que es 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (*por ej.*, 500, 1000 veces) (incluyendo todos los números enteros y puntos decimales entre y por encima de 1, *por ej.*, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, *etc.*) la respuesta producida por un vehículo o una composición de control.

25 Por "disminuir" o "rebajar" o "reducir" o "descender" se entiende en general la capacidad de la composición contemplada en el presente documento para producir, provocar o causar una respuesta fisiológica menor (*es decir*, efectos posteriores) en comparación con la respuesta causada por un vehículo o una molécula/composición de control. Una cantidad "disminuida" o "reducida" es típicamente una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir una disminución que es 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (*por ej.*, 500, 1000 veces) (incluyendo todos los números enteros y puntos decimales entre y por encima de 1, *por ej.*, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, *etc.*) la respuesta (respuesta de referencia) producida por un vehículo, una composición de control, o la respuesta en un linaje celular particular.

30 Por "mantener", o "preservar", o "mantenimiento", o "sin cambio", o "sin cambio sustancial", o "sin disminución sustancial" se entiende en general la capacidad de la composición contemplada en el presente documento para producir, provocar o causar una respuesta fisiológica menor (*es decir*, efectos posteriores) en una célula, en comparación con la respuesta causada por un vehículo, una molécula/composición de control, o la respuesta en un linaje celular particular. Una respuesta comparable es aquella que no es significativamente diferente o mensurablemente diferente de la respuesta de referencia.

35 En un ejemplo, un método de tratamiento de un cáncer en un sujeto que lo necesita comprende la administración de una cantidad eficaz, *por ej.*, una cantidad eficaz terapéuticamente de una composición que comprende células efectoras inmunes modificadas genéticamente contempladas en el presente documento. La cantidad y la frecuencia de la administración se determinarán en función de factores como el estado del paciente, y el tipo y la gravedad de su enfermedad, aunque las dosis adecuadas pueden determinarse mediante ensayos clínicos.

40 En determinados ejemplos, puede ser conveniente administrar linfocitos T activados a un sujeto y luego volver a extraer sangre (o hacer que se realice una aféresis), activar los linfocitos T de ahí y volver a infundir al paciente estos linfocitos T activados y expandidos. Este proceso puede llevarse a cabo varias veces cada pocas semanas. En determinados ejemplos, los linfocitos T pueden activarse a partir de extracciones de sangre de 10 cc a 400 cc. En determinados ejemplos, los linfocitos T se activan a partir de extracciones de sangre de 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc, 100 cc, 150 cc, 200 cc, 250 cc, 300 cc, 350 cc, o 400 cc o más. Sin estar limitado por la teoría, el uso de este protocolo de extracción múltiple de sangre/reinfusión múltiple puede servir para seleccionar determinadas poblaciones de linfocitos T.

La administración de las composiciones contempladas en el presente documento puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, incluso mediante inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. En un ejemplo preferente, las composiciones se administran por vía parenteral. Las frases "administración parenteral" y "administrada por vía parenteral", tal como se utilizan aquí, se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente por inyección, e incluyen entre otros, la inyección intravascular, intravenosa e intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intratumoral, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal y la inyección intrasternal y la infusión. En un ejemplo, las composiciones contempladas aquí se administran a un sujeto por inyección directa en un tumor, un ganglio linfático o un sitio de infección.

En un ejemplo, a un sujeto que lo necesita se le administra una cantidad eficaz de una composición para aumentar la respuesta inmunitaria celular a un cáncer en el sujeto. La respuesta inmunitaria puede incluir respuestas inmunitarias celulares mediadas por linfocitos T citotóxicos capaces de matar células infectadas, respuestas de linfocitos T reguladores, y linfocitos T cooperadores. También se pueden inducir respuestas inmunitarias humorales, mediadas principalmente por linfocitos T cooperadores capaces de activar los linfocitos B, lo que conduce a la producción de anticuerpos. Se pueden utilizar diversas técnicas para analizar el tipo de respuestas inmunitarias inducidas por las composiciones de la presente invención, que están bien descritas en la técnica; *por ej.*, en la publicación *Current Protocols in Immunology*, editada por: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.

En el caso de muerte mediada por linfocitos T, la unión de ligandos a CAR inicia la señalización CAR al linfocito T, lo que resulta en la activación de una variedad de vías de señalización de linfocitos T que inducen al linfocito T a producir o liberar proteínas capaces de inducir la apoptosis de la célula diana por diversos mecanismos. Estos mecanismos mediados por linfocitos T incluyen (entre otros) la transferencia de gránulos citotóxicos intracelulares del linfocito T a la célula diana, la secreción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de linfocitos T que pueden inducir la muerte de la célula diana directamente (o indirectamente a través del reclutamiento de otras células efectoras citolíticas), y la regulación ascendente de ligandos de receptores de muerte (por ej., FasL) en la superficie de los linfocitos T que inducen la apoptosis de la célula diana después de unirse a su receptor de muerte análogo (por ej., Fas) en la célula diana.

En un ejemplo, la presente revelación proporciona un método de tratamiento de un sujeto diagnosticado de cáncer, que comprende la eliminación de las células efectoras inmunes del sujeto, la modificación genética de dichas células efectoras inmunes con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un CAR como se contempla en el presente documento, produciendo así una población de células efectoras inmunes modificadas y administrando la población de células efectoras inmunes modificadas al mismo sujeto. En un ejemplo preferido, las células efectoras inmunes comprenden linfocitos T.

En determinados ejemplos, la presente revelación también proporciona métodos para estimular una respuesta inmunomoduladora mediada por células efectoras inmunes a una población de células diana en un sujeto que comprende las etapas de administración al sujeto de una población de células efectoras inmunes que expresan una construcción de ácido nucleico que codifica una molécula de CAR.

En los métodos de administración de las composiciones celulares descritos aquí, se incluye cualquier método que sea eficaz para dar lugar a la reintroducción de células efectoras inmunes modificadas genéticamente *ex vivo* que expresen directamente un CAR de la invención en el sujeto o a la reintroducción de los progenitores modificados genéticamente de las células efectoras inmunes que al ser introducidas en un sujeto se diferencian en células efectoras inmunes maduras que expresan el CAR. Uno de los métodos comprende la transducción de linfocitos T de sangre periférica *ex vivo* con una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la invención y el retorno de las células transducidas al sujeto.

En determinados ejemplos, un receptor folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 2, Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, o polinucleótidos de VEGFR2, polipéptidos, fragmentos de polipéptido, o anticuerpos de estos, forman parte de un método de prueba diagnóstica acompañante, típicamente para evaluar si un sujeto o sujetos de la población responderán favorablemente a un tratamiento médico específico.

Tal como se utiliza en este documento, el término "prueba diagnóstica acompañante" se refiere a una prueba de diagnóstico que está enlazada a un tratamiento de células efectoras inmunes modificadas genéticamente o por CAR en particular. En un ejemplo en particular, los métodos y kits de diagnóstico comprenden la detección de un receptor de folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha_2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, o un polipéptido VEGFR2 o niveles de expresión de polinucleótido en una muestra biológica, permitiendo así la rápida identificación de los pacientes aptos para el tratamiento de acuerdo con la presente revelación.

Por ejemplo, un determinado producto terapéutico para el cáncer (*por ej.*, las células efectoras inmunes modificadas genéticamente o por CAR que expresan CARs contemplados aquí) podría identificarse como adecuado para un sujeto o determinadas poblaciones de sujetos en función de si el sujeto o sujetos tienen uno o más biomarcadores seleccionados para una determinada enfermedad o afección. Algunos ejemplos biomarcadores son los marcadores séricos/tisulares, así como marcadores que pueden identificarse con técnicas médicas de imagen. En determinados ejemplos, un receptor de folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CALX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha_2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, o un fragmento de polipéptido VEGFR2 (o su polinucleótido correspondiente) puede proporcionar por sí mismo un biomarcador sérico y/o de tejido que puede utilizarse para medir el resultado de fármacos o evaluar la conveniencia del uso de fármacos en un sujeto específico o en una población de sujetos específica.

En ciertos aspectos, la identificación de una indicación tratable que exprese un receptor de folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha_2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, o una secuencia de referencia de polinucleótidos o polipéptidos VEGFR2 puede incluir la caracterización de la expresión diferencial de esa secuencia, ya sea en un sujeto seleccionado, en un tejido seleccionado o de otra manera, como se describe en el presente documento y es conocido por los expertos en la materia.

En ejemplos en particular, los métodos contemplados aquí comprenden la medición o cuantificación del nivel de expresión del preARN, el ARNm o la proteína de un receptor folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha_2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, o un polipéptido VEGFR2 en un cáncer en un sujeto. En un ejemplo, se identifica un sujeto con un cáncer particular tratable con las composiciones contempladas aquí si la expresión del marcador es 10 veces, 25 veces, 50 veces, 100 veces o 1000 veces más alta o más en una muestra biológica que la expresión del marcador en una muestra de control o estándar conocido. En un ejemplo en particular, se identifica a un sujeto como poseedor de una indicación tratable si la expresión de un biomarcador en una muestra biológica es detectable y la expresión del marcador es inferior al nivel de detección en una muestra de control o norma conocida utilizando el mismo método.

La presencia, ausencia o niveles relativos de la expresión de proteína del biomarcador en un cáncer potencial puede analizarse, por ej., mediante técnicas histoquímicas, técnicas inmunitarias, electroforesis, análisis de Western blot, análisis FACS, citometría de flujo y similares. Además, se puede detectar la presencia, ausencia o niveles relativos de expresión de ARN del biomarcador, por ej., mediante técnicas de PCR, análisis de Northern blot, el uso de sondas de oligonucleótidos adecuadas y similares.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, será fácilmente aparente para un experto en la materia a la luz de lo dispuesto en esta invención que se pueden hacer ciertos cambios y modificaciones a esta. Los siguientes ejemplos se presentan a título meramente ilustrativo. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para obtener resultados esencialmente similares.

60

**Ejemplos**

**Ejemplo 1**

5 **Construcción de los CARs**

**1. CAR específico de CD19 (pMND-CD19 CAR)**

10 Los CARs específicos de CD19 fueron diseñados para contener un promotor MND enlazado operativamente a un scFv anti-CD19, un dominio bisagra y transmembrana de CD8 $\alpha$  y un dominio coestimulador de CD137 seguido del dominio de señalización intracelular de la cadena CD3 $\zeta$ . Figura 1A. El CAR CD19 comprende una secuencia de péptidos de señal (SP) CD8 $\alpha$  para la expresión superficial en células efectoras inmunes. La secuencia de polinucleótidos del pMND-CD19 CAR se establece en la ID SEC. N°: 2 y el mapa vectorial se muestra en la figura 2. La tabla 3 muestra la identidad, la referencia en GenBank, el nombre de la fuente y la cita de los diversos segmentos de nucleótidos del vector lentiviral pMND-CD19 CAR.

15

**Tabla 3.**

Nucleótidos	Identidad	Referencia en GenBank	Nombre de la fuente	Cita
1-185	Esqueleto de plásmido de pUC19	Acceso N° L09137.2 nt 1-185	pUC19	New England Biolabs
185-222	Enlace	No procede	Sintético	No procede
223-800	CMV	No procede	pHCMV	(1994)PNAS91: 9564-68
801-1136	R, U5, PBS, y secuencias de empaquetamiento	Acceso N° M 19921.2 nt 454-789	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1137-1139	Codón de inicio de GAG (ATG)	No procede	Sintético	No procede

ES 2 781 073 T3

Nucleótidos	Identidad	Referencia en GenBank	Nombre de la fuente	Cita
	cambió a codón de parada (TAG)			
1140-1240	Secuencia de GAG del VIH-1	Acceso N° M 19921.2 nt 793-893	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1241-1243	Secuencia de GAG del VIH-1 cambió a un segundo codón de parada	No procede	Sintético	No procede
1244-1595	Secuencia de GAG del VIH-1	Acceso N° M 19921.2 nt 897-1248	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1596-1992	VIH-1 pol cPPT/CTS	Acceso N° M 19921.2 nt 4745-5125	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1993-2517	VIH-1, aísla la región Env de HXB3 (RRE)	Acceso N° M14100.1 nt 1875-2399	PgTAT-CMV	Malim, M. H. Nature (1988) 335:181-183
2518-2693	Secuencias de Env de VIH-1 S/A	Acceso N° M 19921.2 nt 8290-8470	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
2694-3231	MND	No procede	pccl-c-MNDU3c-x2	Challita et al. (1995) J.Virol. 69: 748-755
3232-3247	Enlace	No procede	Sintético	No procede

Nucleótidos	Identidad	Referencia en GenBank	Nombre de la fuente	Cita
3248-3310	Péptido señal	Acceso NM_001768	Sintético	No procede
3311-4036	CD19scFv (FMC63)	No procede	Sintético	No procede
4037-4243	TM y bisagra CD8a	Acceso NM_001768	Sintético	Milone <i>et al.</i> (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4244-4369	Dominio de señalización CD137(4-1BB)	Acceso NM_001561	Sintético	Milone <i>et al.</i> (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4370-4708	Dominio de señalización CD3- $\epsilon$ J	Acceso NM_000734	Sintético	Milone <i>et al.</i> (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4709-4838	VIH-1 ppt y parte de 3' U3	Acceso N° M 19921.2 nt 9005-9110	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
4839-4935	VIH-1 parte aleatoria de 3' U3 (399 pb supr. en U3)	Acceso N° M 19921.2 nt 9511-9627	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
4936-4961	Poli-A sintética	No procede	Sintético	Levitt, N. Genes & Dev (1989) 3:1019-1025
4962-5010	Enlace	No procede	Sintético	No procede
5011-7425	Esqueleto de pUC19	Acceso	pUC19	New England
		N° L09137.2 nt 2636-2686		Biolabs

**2. CAR específico de cadena ligera kappa ( $\kappa_{LC}$ ) (pMND-kappa CAR)**

5 Los CARs específicos de cadena ligera kappa fueron diseñados para contener un promotor MND enlazado operativamente a un scFv de cadena ligera anti-kappa, un dominio bisagra y transmembrana de CD8 $\alpha$  y un dominio coestimulador de CD137 seguido del dominio de señalización intracelular de la cadena CD3 $\xi$ . Figura 1B. El  $\kappa_{LC}$  CAR comprende una secuencia de péptidos señal (SP) CD8 $\alpha$  para la expresión superficial en células efectoras inmunes. La secuencia de polinucleótidos del pMND-  $\kappa_{LC}$  CAR se establece en la ID SEC. N°: 3 y el mapa vectorial se muestra en la figura 3. La tabla 4 muestra la identidad, la referencia en GenBank, el nombre de la fuente y la cita de los diversos segmentos de nucleótidos del vector lentiviral de CAR de pMND-cadena ligera kappa.

10

Tabla 4.

Nucleótidos	Identidad	Referencia en GenBank	Nombre de la fuente	Cita
1-185	Esqueleto de plásmido de pUC19	Acceso N° L09137.2 nt 1-185	pUC19	New England Biolabs
185-222	Enlace	No procede	Sintético	No procede
223-800	CMV	No procede	pHCMV	(1994) PNAS 91: 9564-68
801-1136	R, U5, PBS, y secuencias de empaquetamiento	Acceso N° M19921.2 nt 454-789	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1137-1139	El codón de inicio de GAG (ATG) cambió a codón de parada (TAG)	No procede	Sintético	No procede
1140-1240	Secuencia de GAG del VIH-1	Acceso N° M19921.2 nt 793-893	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1241-1243	La secuencia de GAG del VIH-1 cambió a un segundo codón de parada	No procede	Sintético	No procede
1244-1595	Secuencia de GAG del VIH-1	Acceso N° M19921.2 nt 897-1248	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1596-1992	VIH-1 pol cPPT/CTS	Acceso N° M19921.2 nt 4745-5125	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1993-2517	VIH-1, aísla la región Env de HXB3 (RRE)	Acceso N° M14100.1 nt 1875-2399	PgTAT-CMV	Malim, M. H. Nature (1988) 335:181-183

2518-2693	Secuencias de Env de VIH-1 S/A	Acceso N° M 19921.2 nt 8290-8470	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
2694-3231	MND	No procede	pccl-c-MNDU3c-x2	Challita et al. (1995) J.Virol. 69: 748-755
3232-3245	Enlace	No procede	Sintético	No procede
3246-3302	Péptido señal		Sintético	No procede
3303-4061	kappa scFv	No procede	Sintético	No procede
4062-4268	TM y bisagra CD8a	Acceso NM_001768	N° Sintético	Milone <i>et al.</i> (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4269-4394	Dominio de señalización CD137(4-1BB)	Acceso NM_001561	N° Sintético	Milone <i>et al.</i> (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4395-4733	Dominio de señalización CD3-£J	Acceso NM_000734	N° Sintético	Milone <i>et al.</i> (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4734.4960	VIH-1 ppt, U3 y R	Acceso N° M 19921.2 nt 9005-9110	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
4961-4985	Poli-A sintética	No procede	Sintético	Levitt, N. Genes & Dev(1989) 3:1019-1025
4986-5025	Enlace	No procede	Sintético	No procede

5026-7450	Esqueleto de pUC19	Acceso N° L09137.2 nt 2636- 2686	pUC19	New England Biolabs
-----------	--------------------	--	-------	---------------------

## Ejemplo 2

### Transducción de linfocitos T

5 Los sobrenadantes del vector lentiviral (VL) se producen en células HEK 293T, como se describe en las siguientes publicaciones (Naldini *et al.*, 1996, Dull *et al.*, 1998 y Zufferey *et al.*, 1998). La transfección transitoria de plásmidos-5 (HPV 275 que codifica el VIH gag-pol,  $\psi$ /N 15 que codifica la proteína de envoltura VSV-G, p633 que codifica la proteína VIH Rev, HPV601 que codifica la proteína VIH tat, y el vector de expresión de CAR) se utiliza tal como se describe en la  
10 solicitud de PCT N° WO 2012/170911. Los sobrenadantes del LV se concentran entonces por ultracentrifugación o columna de intercambio de iones, seguido de la filtración de flujo tangencial (TFF), formulada en un medio SCGM (CellGenix Inc., DE), y se criopreservan a  $<-70$  °C en crioviales de un solo uso. Los títulos infecciosos se determinan mediante análisis citométrico de flujo de células de osteosarcoma humano (HOS) transducidas (Kutner *et al.*, 2009, Nature Protocols 4:495-505). Para la transducción de linfocitos T humanos, se aíslan linfocitos T humanos primarios de donantes voluntarios sanos  
15 después de la leucaféresis por selección negativa utilizando kits RosetteSep (Stem Cell Technologies). Los linfocitos T se cultivan en RPMI 1640 complementados con un 10% de FCS, 100 U/ml de penicilina, 100 g/mL de sulfato de estreptomicina, 10 mM de Hepes, y se estimulan con esferas magnéticas recubiertas de anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 en una proporción de 1:3 células por esfera. Para los linfocitos T CD8, se añade IL-2 humano (Chiron) cada dos días a una concentración final de 30 UI/mL. Aproximadamente 24 h después de la activación, los linfocitos T se transducen con  
20 vectores lentivirales a una MOI de 5. La transducción de linfocitos T se evalúa mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores específicos para el vector viral y mediante citometría de flujo de 7 a 10 días después de la transducción.

## Ejemplo 3

### VCN de linfocitos T transducidos por CAR

25 Se determinó el número de copia vectorial para la transducción de linfocitos T humanos primarios con el lentivirus pMND-kappa<sub>L</sub>C CAR. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron de donantes normales y se activaron mediante el cultivo con anticuerpos específicos para CD3 y CD28 (Miltenyi Biotec) en medios que contenían IL-2 (CellGenix). Después de la activación, los cultivos de PBMC fueron transducidos con vectores lentivirales o dejados sin  
30 tratar. Los cultivos se mantuvieron para permitir el crecimiento y la expansión de los linfocitos T (7-10 días). En el momento de la obtención, los cultivos comprenden linfocitos T que se han expandido aproximadamente en 2 logs.

35 El número de copia vectorial (VCN) de las partículas lentivirales integradas se determinó mediante q-PCR nueve días después de la transducción. La media de VCN de 12 cultivos únicos de 6 donantes fue de 3,1, figura 4.

## Ejemplo 4

### Expresión de CAR en linfocitos T transducidos

40 Se determinó la expresión en la superficie celular de los receptores de antígenos quiméricos específicos para kappa expresados por un promotor MND (pMND-kappa<sub>L</sub>C CAR) en linfocitos T humanos primarios. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron de donantes normales y se activaron mediante el cultivo con anticuerpos específicos para CD3 y CD28 (Miltenyi Biotec) en medios que contenían IL-2 (CellGenix). Después de la activación, los  
45 cultivos de PBMC fueron transducidos con vectores lentivirales o dejados sin tratar. Los cultivos se mantuvieron para permitir el crecimiento y la expansión de los linfocitos T (7-10 días). En el momento de la obtención, los cultivos comprenden linfocitos T que se han expandido aproximadamente en 2 logs.

50 La expresión de kappa<sub>L</sub>C se determinó por citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos para la Ig de ratón (BD Biosciences) que solo están presentes en los linfocitos T pMND-kappa<sub>L</sub>C modificados por CAR. La citometría de flujo se realizó de seis a nueve días después de la transducción. El nivel medio de expresión de kappa<sub>L</sub>C de 12 cultivos únicos de 6 donantes fue del 35,6%. Figura 5.

**Ejemplo 5****El promotor MND impulsa la expresión de CAR en linfocitos T comparable con el promotor EF1A**

El promotor MND impulsó la expresión de CAR CD19 en linfocitos T modificados fue comparable a la expresión de CD19 CAR impulsada por el promotor EF1 $\alpha$ . Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron de donantes normales y se activaron mediante el cultivo con anticuerpos específicos para CD3 y CD28 (Miltenyi Biotec) en medios que contenían IL-2 (CellGenix). Después de la activación, los cultivos de PBMC fueron transducidos con vectores lentivirales o dejados sin tratar. Los cultivos se mantuvieron para permitir el crecimiento y la expansión de los linfocitos T (7-10 días). En el momento de la obtención, los cultivos comprenden linfocitos T que se han expandido aproximadamente en 2 logs. Al final del cultivo, se ensayó la transducción de linfocitos T mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) utilizando cebadores específicos para las partículas virales. La expresión de CAR CD19 se determinó seis días después de la transducción por citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos para la Ig de ratón (BD Biosciences) que solo están presentes en los linfocitos T modificados por CAR CD19. Tanto la expresión de CAR CD19 como VCN eran comparables entre las diferentes construcciones. Figura 6.

**Ejemplo 6****Reactividad específica del antígeno de linfocitos T**

Se determinó la reactividad específica de antígeno de los linfocitos T pMND kappa<sub>L</sub>C CAR. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron de donantes normales y se activaron mediante el cultivo con anticuerpos específicos para CD3 y CD28 (Miltenyi Biotec) en medios que contenían IL-2 (CellGenix). Después de la activación, los cultivos de PBMC fueron transducidos con vectores lentivirales o dejados sin tratar. Los cultivos se mantuvieron para permitir el crecimiento y la expansión de los linfocitos T (7-10 días). En el momento de la obtención, los cultivos comprenden linfocitos T que se han expandido aproximadamente en 2 logs.

Al final del cultivo, se analizó la reactividad del tumor mediante la liberación de interferón-gamma (IFN $\gamma$ ). Los linfocitos T modificados con el pMND-kappa<sub>L</sub>C CAR secretan IFN $\gamma$  después de un co-cultivo con células kappa<sup>+</sup> Daudi (que expresan kappa<sub>L</sub>C). Por el contrario, el co-cultivo de linfocitos T modificados con el pMND- kappa<sub>L</sub>C CAR con células kappa-negativas HDLM-2 resultó en una liberación de IFN $\gamma$  comparable a la cantidad observada cuando los linfocitos T se cultivaron solos. La liberación de IFN $\gamma$  se determinó usando kits ELISA después de 24 horas de co-cultivo con células kappa-positivas Daudi o kappa-negativas HDLM-2. Figura 7.

**Ejemplo 7****Función antitumoral de los linfocitos T CAR**

Se determinó una función antitumoral de los linfocitos T CAR diseñados para expresar un pMND-kappa<sub>L</sub>C CAR. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron de donantes normales y se activaron mediante el cultivo con anticuerpos específicos para CD3 y CD28 (Miltenyi Biotec) en medios que contenían IL-2 (CellGenix). Después de la activación, los cultivos de PBMC fueron transducidos con vectores lentivirales o dejados sin tratar. Los cultivos se mantuvieron para permitir el crecimiento y la expansión de los linfocitos T (7-10 días). En el momento de la obtención, los cultivos comprenden linfocitos T que se han expandido aproximadamente en 2 logs.

Se establecieron  $2 \times 10^6$  células Daudi marcadas con un gen de luciferasa de luciérnaga en ratones KO de cadena gamma del receptor IL-2 de la cepa NOD (NSG) por inyección intravenosa. Tres, seis y nueve días después de que las células tumorales fueran inyectadas en los ratones,  $1 \times 10^7$  linfocitos T modificados por pMND- kappa<sub>L</sub>C CAR fueron transferidos adoptivamente a los ratones y el crecimiento del tumor fue monitoreado por bioluminiscencia usando un sistema de imágenes Xenogen-IVIS. La carga del tumor se redujo en los ratones a los que se les administró linfocitos T modificados con CAR en comparación con la carga tumoral de los ratones no tratados. Figura 8.

**Ejemplo 8****Generación de un fármaco de CAR T funcional**

Los linfocitos T CAR que expresan anti-BCMA fueron fabricados como se describe en el ejemplo 1, *supra*. Estos linfocitos T CAR mostraron una remisión del tumor específico de antígeno. Los linfocitos T CAR que expresan anti-BCMA fueron co-cultivados durante 4 horas con células K562, o células K562 modificadas para expresar BCMA. Las células tumorales que expresan antígenos fueron marcadas con éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE) y la fluorescencia se midió mediante FACS. Los linfocitos T CAR que expresan anti-BCMA mataron a los linfocitos K562 que expresan BCMA (Figura 9A) y liberaron IFN- $\gamma$  (Figura 9B). (n=3).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> bluebird bio Inc.  
 <120> RECEPTORES DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS DEL PROMOTOR MND  
 <130> BLBD-027/01WO  
 10 <150> US 61/984,561 <151> 2014-04-25  
 <160> 27  
 15 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1 <211> 399 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial <220>  
 20 <223> Secuencia de polinucleótidos del promotor (MND) potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo, con región de control negativo eliminada y sitio de unión al cebador dl587rev sustituido
- |         |   |     |
|---------|---|-----|
| <400> 1 | tttatttagt ctccagaaaa aggggggaat gaaagacccc acctgtaggt ttggcaagct | 60  |
|         | aggatcaagg ttaggaacag agagacagca gaatatgggc caaacaggat atctgtggta | 120 |
|         | agcagttcct gccccgctc agggccaaga acagttgaa cagcagaata tgggccaac    | 180 |
|         | aggatatctg tggtaagcag ttctgcccc ggctcagggc caagaacaga tggtocccag  | 240 |
|         | atgcggtccc gccctcagca gtttctagag aacctcaga tgtttccagg gtgccccaa   | 300 |
|         | gacctgaaat gacctgtgc ottatttgaa ctaaccaatc agttcgcttc tgcgttctgt  | 360 |
|         | tgcgcgctt ctgctcccc agctcaataa aagagccca                          | 399 |
- 25 <210> 2 <211> 7425 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial <220>  
 <223> secuencia de polinucleótidos de una construcción CAR anti-CD19 del promotor MND  
 30
- |         |   |     |
|---------|---|-----|
| <400> 2 | tgcgcgctt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctccc gagacggtca  | 60  |
|         | cagcttctct gtaagcggat gccgggagca gacaagccc tcagggcgcg tcagcgggtg  | 120 |
|         | ttggcgggtg tcggggctgg cttactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc  | 180 |
|         | acctcatat gccagcctat ggtgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat  | 240 |
|         | tacggggtca ttagttcata gccatataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa | 300 |
|         | tggcccgcct ggctgacgc ccaacgaccc ccgccattg acgtcaataa tgacgtatgt   | 360 |
|         | tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggtg | 420 |

ES 2 781 073 T3

aactgccac ttggcagtac atcaagtgt tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt 480  
caatgacggt aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgacottat gggactttcc 540  
tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtgatgc ggttttggca 600  
gtacatcaat gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat 660  
tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa 720  
caactccgcc ccattgacgc aaatgggocg taggcgtgta cggtgaggag tctatataag 780  
cagagctcgt ttagtgaacc gggctctctc ggtagacca gatctgagcc tgggagctct 840  
ctggctaact agggaaccca ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgtcaaag 900  
tagtgtgtgc ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag atccctcaga cccttttagt 960  
cagtggtgaa aatctctagc agtggcggcc gaacagggac ttgaaagcga aagtaaagcc 1020  
agaggagatc tctcgacgca ggactcggct tgctgaagcg cgcacggcaa gagcgagggg 1080  
gcgcgactg gtgagtaogc caaaaatttt gactagcgga ggctagaagg agagagtagg 1140  
gtgcgagagc gtccgtatta agcgggggag aattagataa atgggaaaaa attcggttaa 1200  
ggccaggggg aaagaaacaa tataaactaa aacatatagt tagggcaagc agggagctag 1260  
aacgattcgc agttaatcct ggccttttag agacatcaga aggctgtaga caaatactgg 1320  
gacagctaca accatccott cagacaggat cagaagaact tagatcatta tataatacaa 1380  
tagcagtcct ctattgtgtg catcaaagga tagatgtaaa agacaccaag gaagccttag 1440  
ataagataga ggaagagcaa aacaaaagta agaaaaaggc acagcaagca gcagctgaca 1500  
caggaaccaa cagccaggtc agccaaaatt accctatagt gcagaacctc caggggcaaa 1560  
tggtacatca ggccatatca cctagaactt taaattaaga cagcagtaca aatggcagta 1620  
ttcatccaca attttaaaag aaaagggggg attggggggg acagtgcagg ggaagaata 1680  
gtagacataa tagcaacaga catacaaact aaagaattac aaaaacaaat tacaaaaatt 1740  
caaaattttc gggtttatta cagggacagc agagatccag tttggaaagg accagcaaag 1800  
ctcctctgga aaggtgaagg ggcagtagta atacaagata atagtgacat aaaagtagtg 1860  
ccaagaagaa aagcaaagat catcagggat tatggaaaac agatggcagg tgatgattgt 1920  
gtggcaagta gacaggatga ggattaacac atggaaaaga ttagtaaaac accatagctc 1980  
tagagcgatc ccgatcttca gacctggagg aggagatag agggacaatt ggagaagtga 2040  
attatataaa tataaagtag taaaaattga accattagga gtagcaccca ccaaggcaaa 2100  
gagaagagtg gtgcagagag aaaaaagagc agtgggaata ggagctttgt tccttgggtt 2160  
cttgggagca gcaggaagca ctatgggocg agcgtcaatg acgctgacgg tacaggccag 2220  
acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaatttg ctgagggcta ttgaggcgca 2280

ES 2 781 073 T3

acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag ctccaggcaa gaatcctggc 2340  
 tgtgaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggtgct ctgaaaaact 2400  
 catttgacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc tggaacagat 2460  
 ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca caagcttggc 2520  
 aggtttaaga atagttttt ctgtactttc tatagtgaat agagttaggc agggatattc 2580  
 accattatcg tttcagaacc acctccaac cccgagggga cccgacagge ccgaaggaat 2640  
 agaagaagaa ggtggagaga gagacagaga cagatccatt cgattagtga acggatccat 2700  
 cgattagtcc aatttgtaa agacaggata tcagtgtgcc aggctctagt tttgactcaa 2760  
 caatatcacc agctgaagcc tatagagtac gagccataga tagaataaaa gattttattt 2820  
 agtctccaga aaaagggggg aatgaaagac cccacctgta ggtttgcaa gctaggatca 2880  
 aggttaggaa cagagagaca gcagaatag ggccaacag gatatctgtg gtaagcagtt 2940  
 cctgccccg ctcagggcca agaacagttg gaacagcaga atatgggcca aacaggatat 3000  
 ctgtggtaag cagttcctgc cccggctcag ggccaagaac agatggtccc cagatgcggt 3060  
 cccgcctca gcagtttcta gagaaccatc agatgtttcc agggtgcccc aaggacctga 3120  
 aatgacctg tgccttattt gaactaacca atcagttcgc ttctcgcttc tgttcgctcg 3180  
 cttctgctcc cagagctcaa taaaagagcc cacaaccct cactcggcgc gacgcgtcat 3240  
 agccaccatg gccttaccag tgaccgcctt gctcctgccc ctggccttgc tgcctcacgc 3300  
 cgcaggccg gacatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgctt ctctgggaga 3360  
 cagagtcacc atcagttgca gggcaagtca ggacattagt aatatattaa attggtatca 3420  
 gcagaaacca gatggaactg ttaactcct gatctacat acatcaagat tacaactcagg 3480  
 agtcccatca aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa 3540  
 cctggagcaa gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtacac 3600  
 gttcggaggg gggaccaagc tggagatcac aggtggcggg ggtccggcg gtggtgggtc 3660  
 tggtgccggc ggaagcgagg tgaaactgca ggagtcagga cctggcctgg tggcgcctc 3720  
 acagagcctg tccgtccat gcactgtctc aggggtctca ttaccgact atggtgtaag 3780  
 ctggattcgc cagcctccac gaaaggtct ggagtggctg ggagtaatat gggtagtga 3840  
 aaccacatac tataattcag ctctcaaac cagactgacc atcatcaagg acaactcaa 3900  
 gagccaagtt ttcttaaaaa tgaacagtct gcaaactgat gacacagcca tttactactg 3960  
 tgccaaacat tattactacg gtggtagcta tgctatggac tactggggtc aaggaacctc 4020  
 ggtcaccgtc tcctcaacca cgcgccagc gccgcgacca ccaacaccgg cgcaccat 4080  
 cgcgtcgcag cccctgtccc tgcgccaga ggcgtgccg ccagcggcg gggcgcgagt 4140  
 gcacacgagg gggctggact tcgcctgtga tatctacatc tgggcgcctt tggccgggac 4200

ES 2 781 073 T3

ttgtggggtc cttctcctgt cactggtgat caccctttac tgcaaacggg gcagaaagaa 4260  
 actcctgtat atattcaaac aaccatttat gagaccagta caaactactc aagaggaaga 4320  
 tggctgtagc tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga tgtgaactga gagtgaagtt 4380  
 cagcaggagc gcagacgccc ccgcgtacca gcagggccag aaccagctct ataacgagct 4440  
 caatctagga cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc gggaccctga 4500  
 gatgggggga aagccgagaa ggaagaacct tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa 4560  
 agataagatg gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa ggcgagcggc ggaggggcaa 4620  
 ggggcacgat ggcctttacc aggtctcag tacagccacc aaggacacct acgacgacct 4680  
 tcacatgcag gccctgcccc ctgcctaag acaggtacct ttaagaccaa tgacttacia 4740  
 ggcagctgta gatcttagcc actttttaa agaaaagggg ggactggaag ggctaattca 4800  
 ctcccaaga agacaagatc tgcttttgc ctgtactggg tctctctggt tagaccagat 4860  
 ctgagcctgg gagctctctg gctaactagg gaaccactg ctaagcctc aataaagctt 4920  
 gccttgagtg cttcaatgtg tgtgttggtt ttttgtgtg cgaattcta gcgattctag 4980  
 cttggcgtac cagcctatgg cgctcacaat tccacacaac atacgagccg gaagcataaa 5040  
 gtgtaaagcc tggggtgccct aatgagtgag ctaactcaca ttaattgctg tgcgctcact 5100  
 gcccgctttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc 5160  
 ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgtcgcg 5220  
 ctcggctcgtt cggctcgggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc 5280  
 cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag 5340  
 gaaccgtaaa aaggccgctg tgctggcgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca 5400  
 tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaaccgg acaggactat aaagatacca 5460  
 ggggtttccc cctggaagct ccctcgtcgc ctctcctggt ccgaccctgc cgtttaccgg 5520  
 atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgtt tctcatagct cacgctgtag 5580  
 gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt 5640  
 tcagcccgac cgctgcgctt tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaaagaca 5700  
 cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg 5760  
 cgggtctaca gagtcttga agtggtggcc taactacgac tacactagaa gaacagtatt 5820  
 tggatctgac gctctgctga agccagttac ctccggaaaa agagttggta gctcttgatc 5880  
 cggcaaaaa accaccgctg gtagcggtag tttttttgtt tgcaagcagc agattacggc 5940  
 cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acggggctcg acgctcagtg 6000  
 gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta 6060

ES 2 781 073 T3

```

gatcctttta aattaaat gaagtttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg 6120
gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttgc 6180
ttcatccata gttgcctgac tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc 6240
atctggcccc agtgcctgca tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttatc 6300
agcaataaac cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc 6360
ctccatccag tctattaatt gttgccgga agctagagta agtagttcgc cagttaatag 6420
tttgcccaac gttggttcca ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat 6480
ggcttcattc agctccggtt cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc ccatggttg 6540
caaaaaagcg gtagctcct tcggtcctcc gatcgttgc agaagtaagt tggccgcagt 6600
gttatcactc atggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag 6660
atgcttttct gtgactggtg agtaactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcccgc 6720
accgagttgc tcttgcccgc cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt 6780
aaaagtctc atcattgga aacgttcttc gggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct 6840
gttgagatcc agttcgatgt aaccactcgc tgcacccaac tgatcttcag catcttttac 6900
tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggat 6960
aagggcgaca cgaaatggt gaatactcat actcttctt tttcaatatt attgaagcat 7020
ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catattttaa tgtatttaga aaaataaaca 7080
aataggggtt ccgcgacat tccccgaaa agtgccacct gggactagct ttttgcaaaa 7140
gcctaggcct ccaaaaaagc ctcctcacta cttctggaat agctcagagg ccgagggcgc 7200
ctcggcctct gcataaataa aaaaaattag tcagccatgg ggcggagaat gggcggaaact 7260
gggcggagtt agggcgga tggcgaggt tagggcggg actatggtg ctgactaatt 7320
gagatgagct tgcagccga cattgattat tgactagtcc ctaagaaacc attcttatca 7380
tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca cgaggccctt tcgctc 7425

```

<210> 3

<211> 7450

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial <220>

10

<223> Secuencia de polinucleótidos de una construcción CAR de cadena ligera anti-kappa del promotor MND.

ES 2 781 073 T3

accatcatat gccagcctat ggtgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 240  
 tacggggca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 300  
 tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 360  
 tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 420  
 aactgccac ttggcagtac atcaagtgt tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt 480  
 caatgacggg aaatggccc cctggcatta tgcccagtac atgacottat gggactttcc 540  
 tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atgggtgatgc ggttttggca 600  
 gtacatcaat gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat 660  
 tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa 720  
 caactccgcc ccattgacgc aaatggcgg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag 780  
 cagagctcgt ttagtgaacc gggctctctt ggtagacca gatctgagcc tgggagctct 840  
 ctggctaact agggaaccca ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgctcaaag 900  
 tagtgtgtgc ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag atccctcaga cccttttagt 960  
 cagtggtgaa aatctctagc agtggcggcc gaacagggac ttgaaagcga aagtaaagcc 1020  
 agaggagatc tctcgacgca ggactcggct tgctgaaagc gcacacgcaa gagcgagggg 1080  
 gcggcgactg gtgagtagc caaaaattht gactagcgga ggctagaagg agagagtagg 1140  
 gtgcgagagc gtcggtatta agcgggggag aattagataa atgggaaaaa attcggttaa 1200  
 ggccaggggg aaagaaacaa tataaactaa aacatatagt tagggcaagc agggagctag 1260  
 aacgattcgc agttaatcct ggccttttag agacatcaga aggctgtaga caaatactgg 1320  
 gacagctaca accatccctt cagacaggat cagaagaact tagatcatta tataatacaa 1380  
 tagcagtcct ctattgtgtg catcaaagga tagatgtaa agacaccaag gaagccttag 1440  
 ataagataga ggaagagcaa aacaaaagta agaaaagc acagcaagca gcagctgaca 1500  
 caggaaacaa cagccaggtc agccaaaatt accctatagt gcagaacctc caggggcaaa 1560  
 tggtagatca ggccatatca cctagaactt taaattaaga cagcagtaga aatggcagta 1620  
 ttcatccaca attttaaaag aaaagggggg attggggggg acagtgcagg ggaagaata 1680  
 gtagacataa tagcaacaga catacaaact aaagaattac aaaaacaaat tacaaaaatt 1740  
 caaaattht cgggtttatta cagggacagc agagatccag tttggaaagg accagcaaa 1800  
 ctctctgga aaggtgaagg ggcagtagta atacaagata atagtgacat aaaagtagtg 1860  
 ccaagaagaa aagcaaagat catcagggat tatggaaaac agatggcagg tgatgattgt 1920  
 gtggcaagta gacaggatga ggattaacac atggaaaaga ttagtaaaac accatagctc 1980  
 tagagcgtc ccgatcttca gacctggagg aggagatatg agggacaatt ggagaagtga 2040  
 attatataaa tataaagtag taaaaattga accattagga gtagcaccca ccaaggcaaa 2100

ES 2 781 073 T3

gagaagagtg gtgcagagag aaaaagagc agtgggaata ggagctttgt tccttgggtt 2160  
 cttgggagca gcaggaagca ctatgggcgc agcgtcaatg acgctgacgg tacaggccag 2220  
 acaattattg tctggatatag tgcagcagca gaacaatttg ctgagggcta ttgaggcgca 2280  
 acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag ctccaggcaa gaatcctggc 2340  
 tgtgaaaga tacctaagag atcaacagct cctggggatt tggggttgct ctgaaaaact 2400  
 catttgcacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc tggaacagat 2460  
 ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca caagcttggg 2520  
 aggttaaga atagtttttg ctgtacttcc tatagtgaat agagttaggc agggatattc 2580  
 accattatcg tttcagacc acctccaac cccgagggga cccgacaggc ccgaaggaat 2640  
 agaagaagaa ggtggagaga gagacagaga cagatccatt cgattagtga acggatccat 2700  
 cgattagtcc aatttgtaa agacaggata tcagtgtgctc aggtctagt tttgactcaa 2760  
 caatatcacc agctgaagcc tatagagtac gagccataga tagaataaaa gattttattt 2820  
 agtctccaga aaaagggggg aatgaaagac cccacctgta ggtttgcaa gctaggatca 2880  
 aggttaggaa cagagagaca gcagaatag ggccaacag gatatctgtg gtaagcagtt 2940  
 cctgccccgg ctcaggcca agaacagttg gaacagcaga atatggcca aacaggatat 3000  
 ctgtggtaag cagttcctgc cccggctcag ggccaagaac agatggctcc cagatgcggt 3060  
 cccgccctca gcagtttcta gagaacctc agatgtttcc agggtgccc aaggacctga 3120  
 aatgacctg tgccctattt gaactaacca atcagttcgc ttctcgttc tgttcgcgcg 3180  
 ctctctctcc ccgagctcaa taaaagagcc cacaaccct cactcgggc gacgcgttag 3240  
 ccaccatgga gtttgggtg agctggctt ttcttgtggc tattttaaa ggtgtccagt 3300  
 gogatggtat gctgacccaa actccactct cctgctctgt cagtcttga gatcaagcct 3360  
 ccatctcttg cagatctagt cagagcattt tacatagtac tggagacacc tatttgaat 3420  
 ggtacctgca gaaaccaggc cagtctcaa agctcctgat caacaaagt tccaatgat 3480  
 tgtctgggt cccagacagc ttcagtggca gtggatcagg gacagattc aactcaaga 3540  
 tcagcagagt ggaggctgag gatctgggag tttattactg ctttcaaggc tcacatgttc 3600  
 cgtggacgtt cggaggaggc accaagctgg aatcaaacg ggctgatgct gcaccaactg 3660  
 tatccatctt cccagggtgc ggtggctcgg gcggtggtgg gtcgggtggc ggcggatcac 3720  
 aggtgaagct tcagcagtca ggacctagcc tggggaagcc tggggcttca gtgaagatgt 3780  
 cctgaagc ttctggatac accttactg acttctacat gaagtgggtg aagcagagcc 3840  
 atgaaagag ccttgagtgg attggagata ttaactctaa cattggtgat actttctaca 3900  
 accgaaatt caagggcaag gccacattga ctgtcgaaa atcctccagc acagcctaca 3960

ES 2 781 073 T3

tgcagctcaa cagcctgaca tctgaggact ctgcagteta tttctgttca gttgggtact 4020  
 tcgatgtctg gggcgcaggg accacggtea cegtctctc aaccacgacg ccagcgcgc 4080  
 gaccaccaac accggcgcgc accatcgcgt cgcagcccct gtcctcgcc ccagaggcgt 4140  
 gccggccagc ggcggggggc gcagtgcaca cgagggggct ggacttcgcc tgtgatctct 4200  
 acatctgggc gcccttgcc gggacttggt gggctctct cctgtcactg gtgatcacc 4260  
 tttactgcaa acggggcaga aagaaactcc tgtatatatt caacaacca tttatgagac 4320  
 cagtacaaac tactcaagag gaagatggct gtagctgccg atttccagaa gaagaagaag 4380  
 gaggatgtga actgagagtg aagttcagca ggagcgcaga cccccgcg taccagcagg 4440  
 gccagaacca gctctataac gagtcaatc taggacgaag agaggagtac gatgttttgg 4500  
 acaagagacg tggccgggac cctgagatgg ggggaaagcc gagaaggaag aaccctcagg 4560  
 aaggcctgta caatgaactg cagaagata agatggcgga ggctacagt gagattggga 4620  
 tgaaaggcga gcgccggagg ggcaaggggc acgatggcct ttaccaggt ctcagtacag 4680  
 ccaccaagga cacctacgac gcccttcaca tgcaggccct gcccctcgc taatgacagg 4740  
 tacctttaag accaatgact tacaaggcag ctgtagatct tagccacttt taaaagaaa 4800  
 aggggggact ggaagggcta attcactccc aaagaagaca agatctgctt tttgcctgta 4860  
 ctgggtctct ctgggttagac cagatctgag cctgggagct ctctggctaa ctagggaacc 4920  
 cactgcttaa gcctcaataa agcttgctt gagtgcttca atgtgtgtgt tggttttttg 4980  
 tgtgtcgaaa ttctagcgat tctagcttgg cgtaccagcc tatggcgtc acaattccac 5040  
 acaacatacg agccggaagc ataaagtga aagcctgggg tgccaatga gtgagctaac 5100  
 tcacattaat tgcgttgocg tcaactgccc ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc 5160  
 tgcattaatg aatcgccaa ogcgcgggga gaggcggtt gcgtattggg cgtcttccg 5220  
 ctccctcgt cactgactcg ctgcgctcgg tegtccgct gcggcgagcg gtatcagctc 5280  
 actcaaaggc ggaataacg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt 5340  
 gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc 5400  
 ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa 5460  
 acccgacag actataaaga taccagcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc 5520  
 ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgctt tctccctcg ggaagcgtgg 5580  
 cgctttctca tagctcagc tgtaggtatc tcagttcggg taggtcgtt cgctccaagc 5640  
 tgggctgtgt gcacgaacc cccgttcagc ccgaccgctg cgcttatcc ggtaactatc 5700  
 gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca 5760  
 ggattagcag agcaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact 5820  
 acggctacac tagaagaaca gtatttgta tctgcgctct gctgaagcca gttacctcg 5880

ES 2 781 073 T3

gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt 5940  
 ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct 6000  
 tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga 6060  
 gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaataca 6120  
 tctaaagtat atatgagtaa acttggctcg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac 6180  
 ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtctgttaga 6240  
 taactacgat acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc 6300  
 cagctcacc ggtccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca 6360  
 gaagtggctc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta 6420  
 gagtaagttag ttccagctt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg 6480  
 tgggtgcacg ctctcgtttt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc 6540  
 gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa aagcggtag ctctctcggc cctccgatcg 6600  
 ttgtcagaag taagttggcc gcagtggtat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt 6660  
 ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtgagtac tcaaccaagt 6720  
 cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgctca atacgggata 6780  
 atacccgcc acatagcaga actttaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc 6840  
 gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaacc actcgtgca 6900  
 ccaactgac ttcagcatct tttactttca ccagcgttcc tgggtgagca aaaacaggaa 6960  
 ggcaaatgc cgcaaaaag ggaataaggc cgacacggaa atgttgaata ctcatactct 7020  
 tctttttca atattattga agcatttacc agggttattg tctcatgagc ggatacatat 7080  
 ttgaatgat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc 7140  
 cacctgggac tagctttttg caaaagccta ggctccaaa aaagcctcct cactacttct 7200  
 ggaatagctc agaggccgag gcggcctcgg cctctgcata aataaaaaaa attagtcagc 7260  
 catggggcgg agaatgggcg gaactgggcg gagttagggc cgggatgggc ggagttaggg 7320  
 gcgggactat ggttgctgac taattgagat gagcttgcac gccgacattg attattgact 7380  
 agtccctaag aaaccattct tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg tatcacgagg 7440  
 cctttctgct 7450

<210> 4  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Enlace de péptido flexible

10

<400> 4

**Asp Gly Gly Gly Ser**  
**1 5**

15

<210> 5  
 <211> 5

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Enlace de péptido flexible  
  
 <400> 5  
**Thr Gly Glu Lys Pro**  
 1 5  
 10  
  
 <210> 6  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Enlace de péptido flexible  
 20  
 <400> 6  
**Gly Gly Arg Arg**  
 1  
 25  
 <210> 7  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Enlace de péptido flexible  
  
 35 <400> 7  
**Gly Gly Gly Gly Ser**  
 1 5  
  
 40 <400> 8  
**Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp**  
 1 5 10  
  
 45 <210> 9  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> Enlace de péptido flexible  
  
 <400> 9  
**Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser**  
 1 5 10 15  
 55

Leu Asp

5 <210> 10  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Enlace de péptido flexible

<400> 10  
**Gly Gly Arg Arg Gly Gly Gly Ser**  
 1 5

15

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

20

<220>  
 <223> Enlace de péptido flexible

25

<400> 11  
**Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro**  
 1 5

30

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

35

<220>  
 <223> Enlace de péptido flexible

40

<400> 12  
**Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro**  
 1 5 10

45

<210> 13  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> Enlace de péptido flexible

55

<400> 13

ES 2 781 073 T3

**Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro**  
**1 5 10 15**

- 5 <210> 14  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial <220>
- 10 <223> Secuencias de escisión de polipéptidos  
 <220>  
 <221> VAR\_CARACTERÍSTICA  
 <222> (2)..(3)  
 15 <223> Xaa = Cualquier aminoácido  
 <220>  
 <221> VAR\_CARACTERÍSTICA  
 <222> (5)..(5)  
 20 <223> Xaa = Cualquier aminoácido  
 <220>  
 <221> VAR\_CARACTERÍSTICA  
 <222> (7)..(7)  
 25 <223> Xaa es Gly o Ser  
 <400> 14  
**Glu Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Xaa**  
**1 5**
- 30  
 <210> 15  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Escisión de polipéptidos
- 40  
 <400> 15  
**Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly**  
**1 5**
- 45  
 <210> 16  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- 50  
 <220>  
 <223> Secuencias de escisión de polipéptidos
- 55 <400> 16  
**Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser**  
**1 5**

5 <210> 17  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido autoescindible sintético

10 <400> 17  
 Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn  
 1 5 10 15

15 Pro Gly Pro

20 <210> 18  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Polipéptido autoescindible sintético

<400> 18  
 Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn  
 1 5 10 15

30 Pro Gly Pro

35 <210> 19  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Polipéptido autoescindible sintético

<400> 19  
 Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro  
 1 5 10

45 <210> 20  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Polipéptido autoescindible sintético

55 <220>  
 <223> Polipéptido autoescindible sintético

ES 2 781 073 T3

<400> 20  
Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly  
1 5 10 15

5 Pro

<210> 21  
<211> 20  
<212> PRT  
10 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Polipéptido autoescindible sintético

15 <400> 21  
Gln Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser  
1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro  
20

20 <210> 22  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Polipéptido autoescindible sintético

30 <400> 22  
Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly  
1 5 10 15

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro  
20

35 <210> 23  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Polipéptido autoescindible sintético

45 <400> 23

ES 2 781 073 T3

Val Thr Glu Leu Leu Tyr Arg Met Lys Arg Ala Glu Thr Tyr Cys Pro  
 1 5 10 15

Arg Pro Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys  
 20 25 30

Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr  
 35 40

5

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido autoescindible sintético

15

<400> 24

Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro  
 1 5 10 15

Gly Pro

20

<210> 25

<211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Polipéptido autoescindible sintético

<400> 25

Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val  
 1 5 10 15

Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly  
 20 25 30

30

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro  
 35 40

35

<210> 26

<211> 33

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

# ES 2 781 073 T3

<223> Polipéptido autoescindible sintético

<400> 26

Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu  
1 5 10 15

Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly  
5 20 25 30  
Pro

<210> 27

<211> 10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de Kozak de consenso

<400> 27

20 gccrccatgg

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.Un vector lentiviral que comprende un polinucleótido que comprende un promotor (MND) potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo, con la región de control negativo eliminada y el sitio de unión al cebador dl587rev sustituido enlazado operativamente a un ácido nucleico que codifica un receptor de antígenos quiméricos (CAR), donde el CAR comprende:
- 10 (a) un scFv;
- (b) una región bisagra de CD8 $\alpha$ ;
- (c) un dominio transmembrana de CD8 $\alpha$ ;
- 15 (d) un dominio de señalización coestimulador de CD137; y
- (e) un dominio de señalización primario de CD3 $\xi$ .
- 20 2.El vector lentiviral de la reivindicación 1, donde el scFv se une a un antígeno seleccionado de un grupo formado por: receptor folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR incluyendo ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE 1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-AI+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha_2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, mesotelina, Mucl, Mucl6, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivin, TAG72, TEMs, y VEGFR2.
- 25 3.El vector lentiviral de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el CAR comprende además un polipéptido de región bisagra, una región espaciadora o un péptido señal.
- 30 4.El vector lentiviral de la reivindicación 1, donde el polinucleótido codifica un CAR como se establece en cualquiera de las ID SEC N $^{\circ}$ : 2-3.
- 5.El vector lentiviral de la reivindicación 1, donde:
- 35 el vector lentiviral se selecciona del grupo formado por: el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); el virus del Maedi-Visna (VMV); el virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV); el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV); el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV); el virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV); y el virus de la inmunodeficiencia en simios (SIV).
- 40 6.El vector lentiviral según una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 5, que comprende una LTR retroviral izquierda (5'), una señal de empaquetamiento Psi ( $\psi$ ), un flap tracto/ADN de polipurina central (cPPT/FLAP), un elemento de exportación retroviral; un promotor MND enlazado operativamente al CAR de la reivindicación 1; y una LTR retroviral derecha (3').
- 45 7.El vector lentiviral de la reivindicación 6, comprendiendo además:
- a) una secuencia de poliadenilación heteróloga;
- b) una secuencia de poliadenilación heteróloga que es una secuencia de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina o una secuencia de señal de poliadenilación de la globina  $\beta$  de conejo; o
- 50 c) un elemento regulatorio post-transcripcional del virus de la hepatitis B (HPRE) o un elemento regulatorio post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE).
- 55 8.El vector lentiviral de cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, donde
- (a) el promotor de la LTR 5' es sustituido por un promotor heterólogo;
- (b) el promotor de la LTR 5' es sustituido por un promotor del citomegalovirus (CMV), un promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), o un promotor del virus del simio 40 (SV40);
- 60

- (c) la LTR 5' o LTR 3' es una LTR lentiviral;
  - (d) la LTR 3' comprende una o más modificaciones;
  - 5 (e) la LTR 3' comprende una o más supresiones; o
  - (f) la LTR 3' es una LTR autoinactivable (SIN).
- 9.Una célula efectora inmune que comprende el vector lentiviral de una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 8.
- 10 10.La célula efectora inmune de la reivindicación 9, donde la célula efectora inmune es un linfocito T.
- 11.Una composición que comprende la célula efectora inmune de la reivindicación 9 o la reivindicación 10 y un excipiente fisiológicamente aceptable.
- 15 12.Una composición según la reivindicación 11 para el uso en un método de tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.
- 20 13.Una composición según la reivindicación 11 para el uso en un método de tratamiento de una neoplasia hematológica en un sujeto que lo necesite.

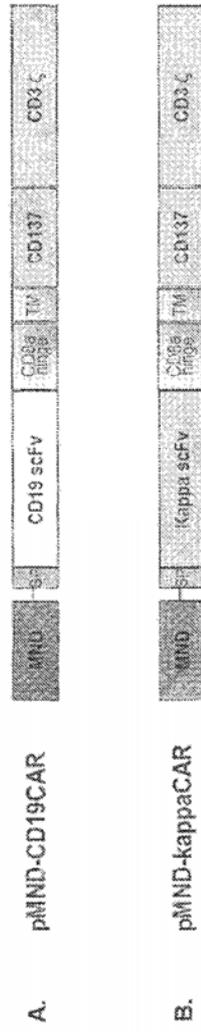


Figura 1

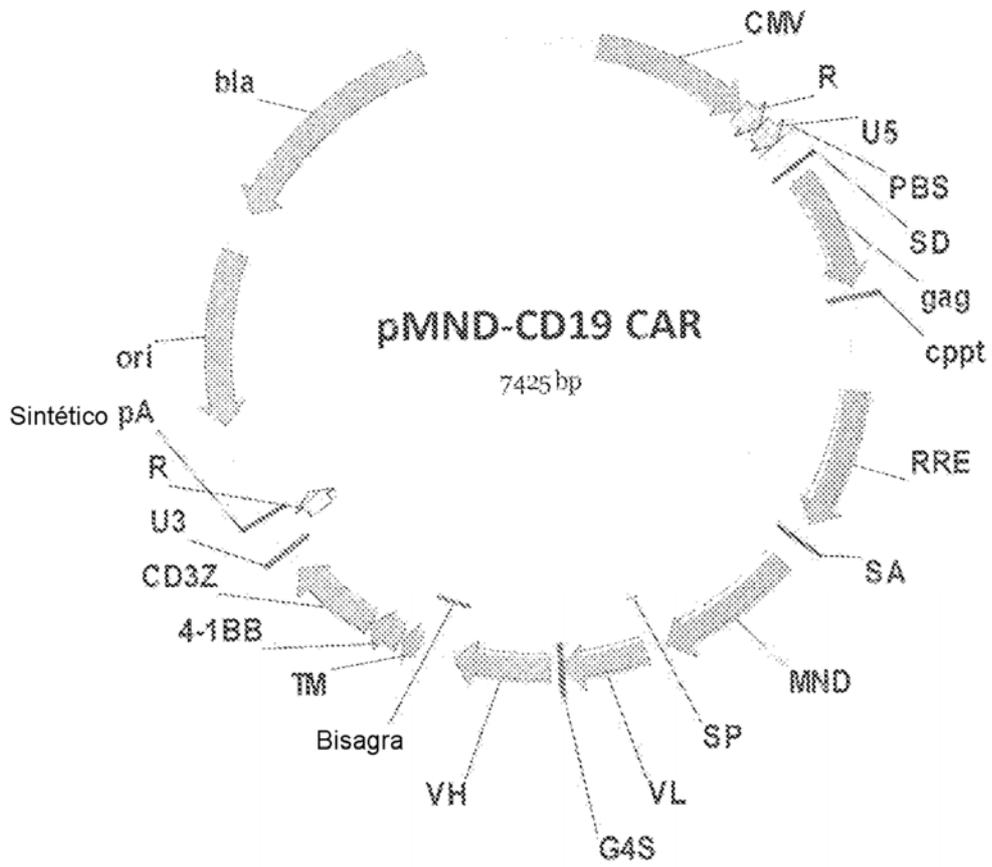


Figura 2

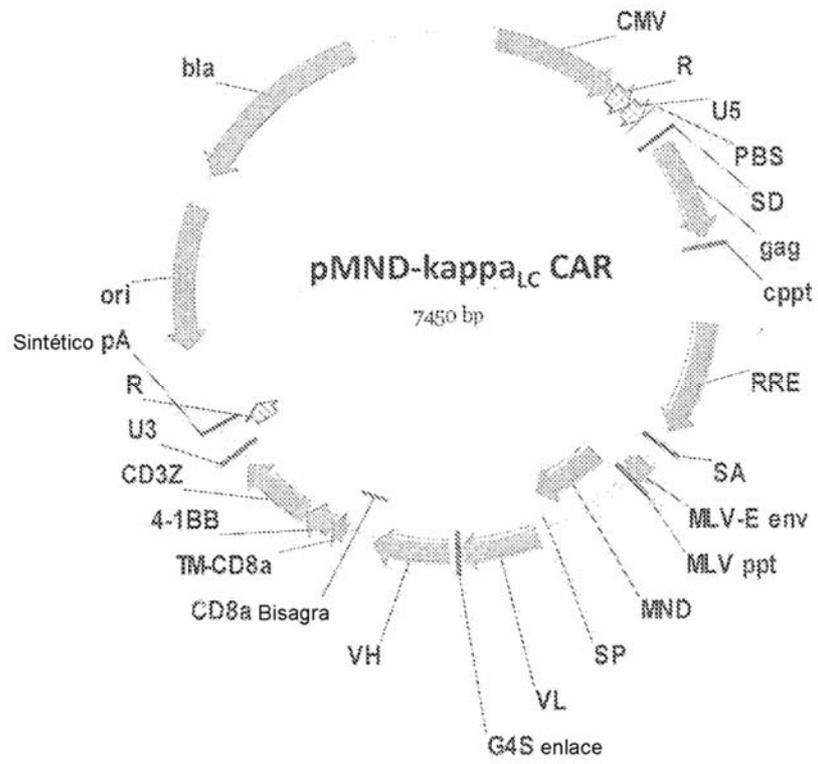


Figura 3



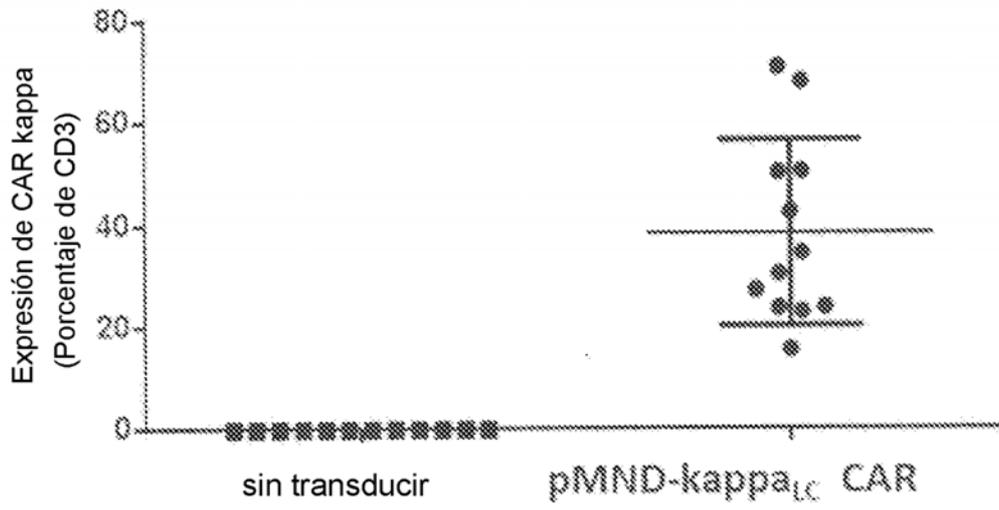


Figura 5

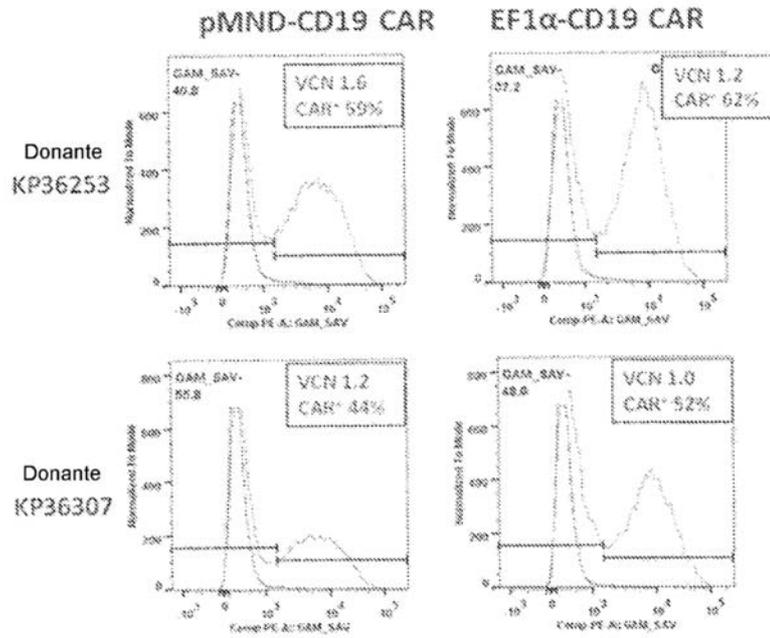


Figura 6

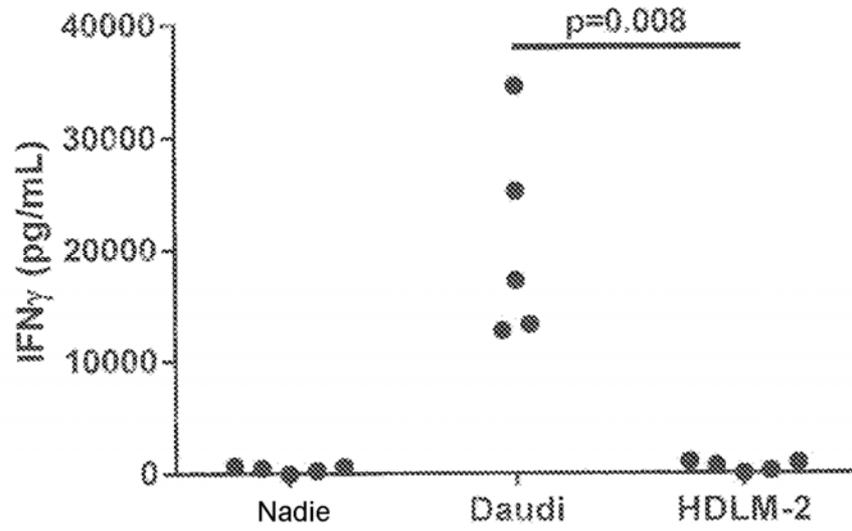


Figura 7

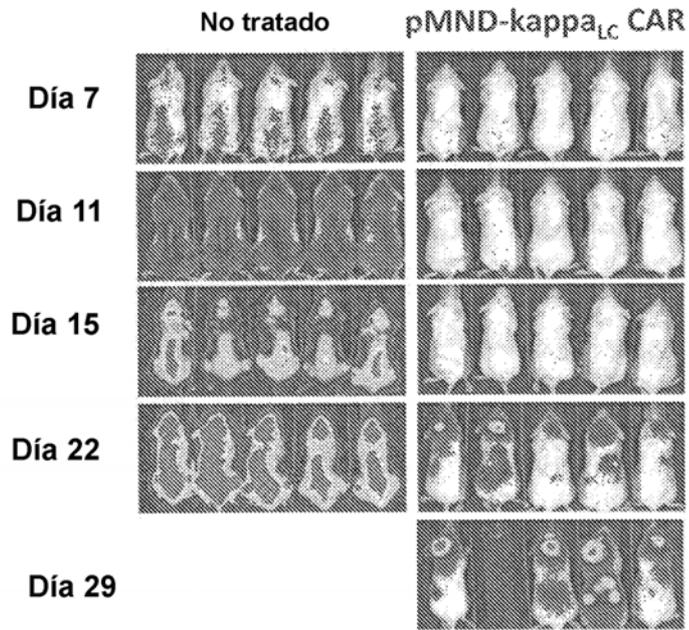


Figura 8

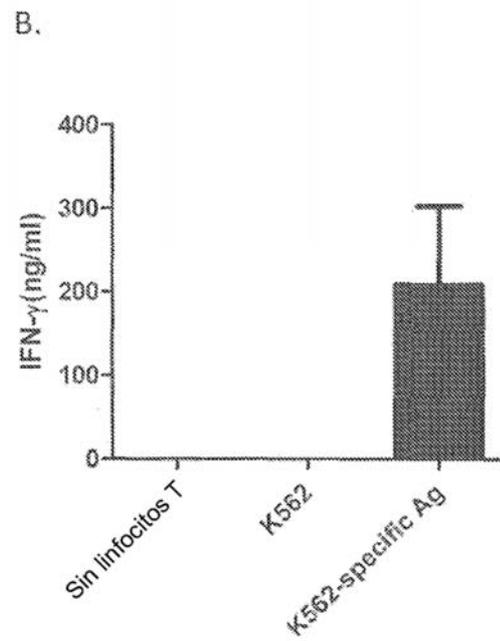
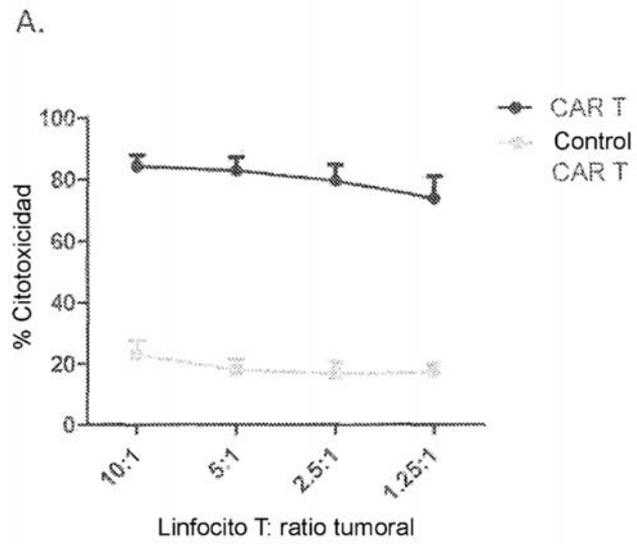


Figura 9