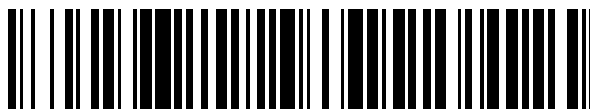


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 789 330**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2016** **PCT/US2016/015351**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2016** **WO16123333**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2016** **E 16704526 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020** **EP 3250587**

54 Título: **Receptores de antígeno quimérico, composiciones y métodos**

30 Prioridad:

**29.01.2015 US 201562109281 P**

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

**26.10.2020**

73 Titular/es:

**REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA  
(100.0%)**

**600 McNamara Alumni Center, 200 Oak St. SE  
Minneapolis, MN 55455, US**

72 Inventor/es:

**KAUFMAN, DAN, SAMUEL;  
LAMPI HERMANSON, DAVID, LEE y  
MORIARITY, BRANDEN, SCOTT**

74 Agente/Representante:

**SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio**

ES 2 789 330 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 antígeno quimérico, composiciones y métodos

5 Resumen

10 La presente invención está dirigida a un receptor de antígeno quimérico que comprende: un ectodominio que comprende una región de reconocimiento de antígeno; un dominio transmembrana unido al ectodominio, en donde el dominio transmembrana comprende una región transmembrana de NKG2D en orientación inversa; y un endodominio unido al dominio transmembrana, en donde el endodominio comprende al menos un dominio de señalización que activa una célula NK.

15 La presente invención incluye, además, una célula NK que comprende el receptor de antígeno quimérico de la invención, una iPSC que comprende el receptor de antígeno quimérico de la invención y una composición farmacéutica que comprende esta célula NK o iPSC. En la medida en que otros receptores de antígenos quiméricos, células NK, iPSC y composiciones farmacéuticas se describen en el presente documento, se incluyen simplemente con fines de referencia.

20 Esta descripción describe, en un aspecto, un receptor de antígeno quimérico para la expresión en una célula *Asesina natural* (NK). En general, el receptor del antígeno quimérico incluye un ectodominio que incluye una región de reconocimiento de antígeno, un dominio transmembrana unido al ectodominio y un endodominio unido al dominio transmembrana. El endodominio puede incluir un péptido de señalización que activa una célula NK.

25 En algunas modalidades, el dominio de reconocimiento de antígeno puede unirse específicamente a un antígeno asociado con una enfermedad.

En algunas modalidades, el dominio de reconocimiento del antígeno puede unirse específicamente a un antígeno tumoral.

30 En algunas modalidades, el ectodominio puede incluir además un péptido señal o secuencia líder y/o un espaciador.

En algunas modalidades, el endodominio puede incluir un dominio de señalización de una proteína adaptadora de señalización unida a la membrana de la célula NK tal como, por ejemplo, 2B4, DAP10, DAP12, IL21R, CD137 (41BB) o CD3Z.

35 En algunas modalidades, el dominio transmembrana puede incluir una región transmembrana de un receptor de citotoxicidad natural expresado en células NK tales como, por ejemplo, CD16, NKp44, NKp46 o NKG2D.

40 En otro aspecto, esta descripción describe una composición farmacéutica que incluye una célula NK (y/o iPSC) modificada para expresar cualquier modalidad del receptor de antígeno quimérico resumido anteriormente.

45 En otro aspecto, esta descripción describe un método para proporcionar inmunoterapia a un sujeto que tiene una afección. Generalmente, el método incluye administrar al sujeto la composición terapéutica antes resumida, en la que la región de reconocimiento de antígeno del receptor de antígeno quimérico se une específicamente a un antígeno asociado con la afección.

50 El resumen anterior no pretende describir cada modalidad descrita o cada implementación de la presente invención. La descripción a continuación ejemplifica con mayor particularidad modalidades ilustrativas. En varios lugares a lo largo de la solicitud, se proporciona orientación a través de listas de ejemplos, los cuales se pueden usar en varias combinaciones. En cada caso, la lista mencionada sirve solo como un grupo representativo y no debe interpretarse como una lista exclusiva.

Shimasaki y col. (*Cytotherapy* (2012) 14: 7: 830-840) se refieren a un método clínicamente adaptable para mejorar la citotoxicidad de las células asesinas naturales contra las neoplasias malignas de células B.

55 El documento WO2005/044996 se refiere a un receptor quimérico capaz de señalar tanto una ruta primaria como coestimuladora, permitiendo así la activación de la ruta coestimuladora sin unirse al ligando natural.

60 Altwater y col. (*Clin. Cancer Res.* (2009) 15: 15: 4857-4866) se refieren a la señalización de ZB4 (CD244) por receptores quiméricos recombinantes específicos de antígenos que coestimulan la activación de las células asesinas naturales para las células de neuroblastoma y leucemia.

65 El documento WO2013/126729 se refiere a composiciones y métodos para tratar el cáncer en un ser humano, que incluye la administración de una célula T genéticamente modificada que expresa un CAR que tiene un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana, un dominio de señalización CD2 y un dominio de señalización CD3 zeta.

El documento WO2015/168613 se refiere a composiciones que comprenden al menos un receptor de autoanticuerpos

quiméricos (CAAR) específico para un autoanticuerpo, vectores que comprenden al mismo, composiciones que comprenden vectores de CAAR empaquetados en partículas virales y células T recombinantes que comprenden al CAAR.

## 5 Breve descripción de las figuras

Figura 1. (A) Receptores de citotoxicidad natural ilustrativos y el efecto de unión de esos receptores con sus ligandos en la degranulación y la polarización de las células NK y la destrucción de las células diana. (B) Ejemplos representativos de receptores de citotoxicidad natural y sus correspondientes adaptadores de señalización. (C) Construcción de receptor de antígeno de células T, quimérico, de tercera generación, utilizado en células NK derivadas de iPSC.

Figura 2. (A) Una ilustración esquemática generalizada de un CAR activador de NK. (B) Esquema de novedosas construcciones de receptores de antígeno quiméricos. Los receptores de antígeno quiméricos se clonan en un vector pkt2 que contiene un IR/DR para usar con la transposasa SB100X, un promotor de mCAG, una secuencia del receptor de antígeno quimérico (CAR), un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y un marcador de selección GFP:Zeo. Se obtuvieron fragmentos del receptor de antígeno quimérico de UniProt y se ensamblaron mediante síntesis de gBlock y clonación tradicional con enzimas de restricción (IDT).

Figura 3. Expresión superficial de receptores de antígeno quiméricos en células NK92 e iPS. Las células NK92 o las células iPS se transfectan mediante el uso del sistema de transposón *Sleeping Beauty* con SB 100X. Luego las células se seleccionaron mediante el uso de Zeocina y se realizó citometría de flujo para evaluar la expresión en la superficie celular de los diversos receptores de antígeno quiméricos. La expresión se evaluó mediante el uso de un anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón conjugado con biotina que reconoce el fragmento IgG F(ab')<sub>2</sub> de ratón (Jackson Immuno-Research Laboratories, Inc., West Grove, PA, cat. # 115-065-072). El anticuerpo unido se detectó mediante el uso de estreptavidina conjugada con un colorante fluorescente.

Figura 4. Liberación de CD107A y producción de IFN- $\gamma$  en células NK92. La degranulación de células NK92 y la producción de citocinas se evaluaron mediante citometría de flujo. Las células NK92 se mezclaron 1:1 con células diana de cáncer de ovario negativas para mesotelina (MA148), positivas para mesotelina (A1847), o perlas de proteína A con o sin conjugación a una proteína quimérica mesotelina/Fc. Las células se tiñeron para CD107a y se realiza la tinción intracelular para la producción de IFN- $\gamma$ .

Figura 5. Ensayo de liberación de Cr-51 mediante el uso de células NK92. Las células NK92, NK92/28/41BB/CD3 o NK92/CAR4 se incubaron durante 4 horas a las proporciones indicadas con células K562, K562 mesotelina+, MA148 o A1847. Después se detectó la liberación de Cr-51 para evaluar la muerte celular. Este experimento se realizó como en Woll y col., 2009, *Blood* 113 (24): 6094-6101, excepto que se usaron células NK derivadas de iPSC en lugar de células NK derivadas de hESC.

Figura 6. Otros receptores de antígeno quiméricos activadores de NK ilustrativos.

Figura 7. Ilustración esquemática que compara un CAR de células T de 3<sup>ra</sup> generación con las construcciones ilustrativas de CAR de NK reflejadas en la Figura 2.

Figura 8. Ilustración esquemática de construcciones ilustrativas de CAR de NK.

Figura 9. Ilustración esquemática de construcciones ilustrativas de CAR de NK.

Figura 10. Datos que muestran la citotoxicidad de los CAR de NK contra las células K562

Figura 11. Datos que muestran la citotoxicidad de los CAR de NK contra dos líneas celulares de cáncer de ovario.

Figura 12. Datos que muestran la expresión de un CAR de NK ilustrativo por células madre pluripotentes inducidas.

Figura 13. Datos que muestran la expresión de superficie de un CAR ilustrativo por expresión de células NK derivadas de iPSC. Figura 14. Una construcción ilustrativa generalizada de un vector de CAR de NK.

Figura 15. Una construcción ilustrativa generalizada de un vector de CAR de NK. Los aisladores de cHS4 en tándem pueden inhibir el silenciamiento del vector del CAR y, por lo tanto, mejorar la expresión del CAR en células NK e iPSC.

## 60 Descripción detallada de las modalidades ilustrativas

La presente invención incluye un receptor de antígeno quimérico que comprende: un ectodominio que comprende una región de reconocimiento de antígeno; un dominio transmembrana unido al ectodominio, en donde el dominio transmembrana comprende una región transmembrana de NKG2D en orientación inversa; y un endodominio unido al dominio transmembrana, en donde el endodominio comprende al menos un dominio de señalización que activa una célula NK.

Esta descripción describe receptores de antígeno quiméricos diseñados para incorporar específicamente dominios de activación de células NK. Los receptores de antígenos quiméricos pueden incorporar regiones intracelulares y/o transmembrana que incluyen, por ejemplo, regiones intracelulares y/o transmembrana de CD16, NKp44, NKp46 y/o NKG2D, unidas a dominios de coactivación o señalización de, por ejemplo, 2B4 (CD244), CD137 (41BB), IL21R, DAP10, DAP12 y/o CD3Z.

Los receptores de antígeno quiméricos (CAR) son receptores artificiales diseñados que pueden proporcionar una especificidad modificada a una célula inmunitaria que expresa el CAR. En general, se puede recolectar una población de células inmunitarias de un sujeto que tiene una forma particular de cáncer. Las células inmunitarias recolectadas pueden modificarse para expresar un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a los antígenos expresados por las células tumorales, y después se vuelven a introducir en el sujeto. Las células inmunitarias modificadas que expresan el receptor de antígeno quimérico son más capaces de reconocer y matar las células tumorales que expresan el (los) antígeno(s) reconocido(s) específicamente por el receptor de antígeno quimérico.

Los receptores de antígeno quiméricos se han diseñado para activar las células T para el tratamiento de ALL refractaria (dirigido a CD 19), cáncer de páncreas (dirigido a mesotelina) y otras neoplasias malignas. Existen varias construcciones de receptores de antígeno quiméricos, pero la mayoría fueron diseñadas para activar las células T.

Por el contrario, los receptores de antígeno quiméricos descritos en el presente documento están diseñados para expresarse en células madre pluripotentes inducidas (iPSC), que después pueden diferenciarse en células NK. También se pueden expresar directamente en células NK de sangre periférica (PB), células NK-92 u otra línea celular NK adecuada. Las células NK-92 u otras líneas celulares NK se han utilizado en estudios clínicos para la terapia contra el cáncer. Las células NK que expresan el receptor de antígeno quimérico se pueden usar como inmunoterapia para el tratamiento de múltiples cánceres. Los receptores de antígeno quiméricos descritos en el presente documento pueden incluir un dominio de señalización que podría usarse con porciones de reconocimiento de antígeno de diversos anticuerpos dirigidos. Específicamente, esta descripción describe modalidades ilustrativas que reflejan receptores de antígeno quiméricos dirigidos a mesotelina para el tratamiento del cáncer de ovario. Sin embargo, las modalidades descritas pueden tener una utilidad más amplia, ya que la mesotelina se expresa en muchos adenocarcinomas. Además, el dominio dirigido a mesotelina descrito es meramente ilustrativo; otros fragmentos variables de cadena única (scFV) se pueden diseñar en las construcciones de señalización del receptor de antígeno quimérico específico para NK (NK-CAR) para atacar esencialmente cualquier neoplasia maligna.

Una característica de los receptores de antígeno quiméricos de células NK descritos en el presente documento es que se pueden eludir las moléculas adaptadoras/proteínas accesorias que los receptores de citotoxicidad natural necesitan para iniciar la transducción de señales. Alternativa o adicionalmente, incluir el dominio transmembrana de receptores que típicamente se asocian con una molécula adaptadora/proteína accesorio, puede permitir que las proteínas accesorias también se unan, lo que hace más probable el inicio de la transducción de señales. Los receptores de antígeno quiméricos de células NK diseñados para incluir, por ejemplo, CD3Z pueden permitir eludir otros receptores de citotoxicidad natural. La incorporación de los dominios transmembrana y otros dominios intracelulares puede permitir que estos receptores de antígeno quiméricos de células NK se asocien con proteínas adaptadoras y proporcionen una señalización mejorada sobre CD3Z solo mediante la activación de múltiples vías.

Si bien algunas construcciones de receptores de antígeno quiméricos de células T pueden activar las células NK en cierto grado debido a dominios de señalización compartidos, los receptores de antígeno quiméricos descritos en el presente documento están diseñados específicamente para activar las células NK. Los receptores de antígeno quiméricos diseñados para activar específicamente las células NK pueden mejorar la función NK y la utilidad del receptor en la inmunoterapia con células NK, como, por ejemplo, la muerte, mediada por células, de tumores refractarios.

Un receptor de antígeno quimérico típicamente incluye un ectodominio, un dominio transmembrana y un endodominio. El endodominio típicamente reside en el citoplasma de la célula. Una vez que un antígeno es reconocido por el ectodominio, el endodominio transmite una señal de activación a la célula NK que induce a la célula NK a destruir la célula diana tumoral. Los endodominios de señalización ilustrativos incluyen, por ejemplo, los dominios de señalización de proteínas adaptadoras de señalización unidas a membrana, que incluyen, por ejemplo, 2B4 (CD244), CD137 (41BB), IL21R, DAP10, DAP12 y/o CD3Z, o una porción de estas que incluye, por ejemplo, un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM), un motivo YxxM, un motivo TxYxxV/I, FcRy, NKp80 (señalización a través de un hemi-ITAM atípico), y/o DNAM, etcétera.

El dominio transmembrana atraviesa la membrana plasmática y une el endodominio con el ectodominio. Los dominios transmembrana ilustrativos incluyen, por ejemplo, los dominios intracelulares y/o transmembrana de receptores de citotoxicidad natural (NCR) que incluyen, por ejemplo, CD16, NKp44, NKp46, NKG2D, NKp30, NKp80 y/o DNAM-1, o una porción de estos, que incluye, por ejemplo, uno o más aminoácidos cargados. En algunas modalidades, el aminoácido cargado puede ser un residuo de lisina y/o arginina. En algunos casos, una región transmembrana puede ser de una proteína transmembrana, lo que significa que tiene de forma nativa un C-terminal extracelular en lugar de un N-terminal extracelular. En estos casos, se puede invertir la orientación de la región transmembrana, indicada en, por ejemplo, la Figura 6 como "Rev TM" de forma que el receptor de antígeno quimérico se oriente adecuadamente en la membrana de la célula NK.

El ectodominio generalmente incluye un péptido señal y una región de reconocimiento de antígeno. En muchas modalidades, el ectodominio también puede incluir un espaciador. El péptido señal dirige el polipéptido naciente hacia el retículo endoplásmico para que pueda glicosilarse adecuadamente y anclarse en la membrana plasmática. En general, cualquier péptido señal eucariótico se puede usar siempre que dirija la proteína al retículo endoplásmico. Un péptido señal ilustrativo incluye la secuencia líder de CD8a, pero otras secuencias de péptidos señal pueden ser adecuadas. El espaciador, cuando está presente, une el dominio de reconocimiento de antígeno con el dominio transmembrana. El espaciador típicamente ofrece flexibilidad para que la región de reconocimiento de antígeno sea libre de orientarse en diferentes direcciones, lo que permite así que la región de reconocimiento de antígeno se una a las dianas del antígeno. Un espaciador ilustrativo incluye la secuencia bisagra de CD8a, pero otras regiones bisagra de Ig pueden ser adecuadas. La región de reconocimiento de antígeno puede incluir cualquier secuencia peptídica que sea capaz de unirse específicamente a una diana designada. Como se usa en el presente documento, "unión específica" y sus variaciones se refieren a tener una afinidad diferencial o no general, en cualquier grado, por una diana particular. Por lo tanto, la región de reconocimiento de antígeno puede incluir un fragmento de un anticuerpo tal como, por ejemplo, un scFv o un Fab que se une específicamente a un antígeno en particular tal como, por ejemplo, un antígeno tumoral, un antígeno viral, un autoantígeno modificado, etcétera. En algunas modalidades, el scFv puede ser de un anticuerpo monoclonal. Un receptor de antígeno quimérico puede diseñarse para incluir una región de reconocimiento de antígeno que puede unirse específicamente a cualquier objetivo designado. Por lo tanto, si bien la figura 2, la figura 6, la figura 7 y la figura 8 muestran modalidades que están diseñadas para unirse específicamente a la mesotelina, un receptor de antígeno quimérico activador de NK puede diseñarse para unirse específicamente y, por lo tanto, dirigirse a cualquier antígeno asociado con las células que están destinadas a ser el objetivo de la muerte mediada por células NK, que incluyen, por ejemplo, las células tumorales o infectadas por virus. Por ejemplo, las células NK y/o los CAR han demostrado actividad contra diversos tumores sólidos y células infectadas por virus, que incluyen, pero no se limitan a, VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), hepatitis B, hepatitis C, CMV (citomegalovirus), EBV (virus de Epstein-Barr), VPH (virus del papiloma humano) y otros.

Así, por ejemplo, para mediar mejor la citotoxicidad de las células NK contra tumores que incluyen células que expresan mesotelina (por ejemplo, cánceres de ovario, cánceres pancreáticos, cánceres de pulmón, adenocarcinomas de colon, mesoteliomas y otros adenocarcinomas que expresan mesotelina), un receptor de antígeno quimérico como los mostrados en la figura 2, la figura 6, la figura 7 y la figura 8, puede ser diseñado y expresado en las células NK. Las construcciones ilustradas de receptores de antígeno quiméricos contienen un dominio transmembrana específico de células NK y dominios de activación, y es capaz de expresarse en NK92, línea de células tumorales NK. Las regiones transmembrana e intracelular se tomaron de CD16, Nkp44, Nkp46 y/o NKG2D, mientras que los dominios de activación de 2B4, DAP10, DAP12 y/o CD3ζ se combinaron de una forma que pretende activar al máximo las células NK. La Figura 3 muestra que las células NK92 e iPS expresaron los receptores de antígeno quiméricos mostrados en la Figura 2.

Para evaluar la función de los receptores de antígenos quiméricos, las células NK que expresan los receptores de antígenos quiméricos se analizaron contra perlas recubiertas de antígeno y líneas celulares que expresan mesotelina. La Figura 4 muestra que los receptores de antígeno quiméricos de la Figura 2 aumentan la degranulación y la producción de citocinas de las células NK cuando las células NK que expresan los receptores de antígeno quiméricos se mezclaron con dianas positivas para mesotelina.

La Figura 5 muestra que las células NK92 que expresan un receptor de antígeno quimérico específico de NK como se describe en el presente documento, mejoraron la muerte *in vitro* de células diana positivas para mesotelina en comparación con un receptor de antígeno quimérico específico de células T de tercera generación (NK92/28/41BB/OPB3ζ o células NK92 no transfectadas).

La Figura 9 muestra la citotoxicidad de CAR de NK ilustrativos contra células K562 (panel superior izquierdo) y células K562 que expresan mesotelina (panel superior derecho) que es la diana de los CAR. Estos resultados muestran una notable mejora en la muerte en una forma específica de mesotelina, especialmente para el CAR 7 y el CAR 9. El panel inferior es un resumen de los resultados expresados en unidades líticas (Bryant y col., 1992, *J Immunol Methods* 146 (1): 91-103). El CAR 7 y el CAR 9 exhiben una citotoxicidad marcadamente mayor que el CAR de 3ª generación de células T utilizada en estudios previos (NK92 meso 3ª). La citotoxicidad se mide mediante el uso de un ensayo de liberación de Cr-51 como se describió previamente (Knorr y col., 2013, *Stem Cells Transl Med* 2 (4): 274-283; Woll y col., 2009, *Blood* 113 (24): 3094-6101; Woll y col., 2005, *J Immunol* 175 (8): 5095-5103). La Figura 10 muestra resultados similares mediante el uso de dos líneas celulares de cáncer de ovario que tienen alta expresión de meso (A1497) y baja expresión de meso (MA148). Las células NK92 con diferentes CAR anti-meso basadas en células NK matan de una forma específica para meso. El panel inferior nuevamente refleja un resumen expresado en unidades líticas. Además, los CAR de NK median la expresión incrementada de CD107a y/o IFN-γ cuando se estimulan con dianas como en la Figura 9 y la Figura 10 (datos no mostrados).

En algunas modalidades, un receptor de antígeno quimérico específico de NK como se describe en el presente documento puede expresarse en iPSC, que después pueden diferenciarse en células NK. Las iPSC pueden diferenciarse como se describe en Knorr y col., 2013, *Stem Cells Transl Med*. 2 (4): 274-283 o Ni y col., 2014, *Stem Cells* 32 (4): 1021-1031. La Figura 11 muestra la expresión de un CAR de NK ilustrativo por las células madre pluripotentes inducidas (iPSC), como se muestra por la producción de células CD45+ CD56+ (fila superior, 5º panel). La Figura 12 muestra la expresión superficial de CAR por células NK derivadas de iPSC. Las tres filas inferiores de la Figura 12 muestran la

expresión del CAR sólo en la superficie de iPSC-CAR4v2 (4ta columna, tres filas inferiores) en comparación con las células PB-NK y células iPSC-NK que no expresan CAR (células de control no modificadas, 4ta columna, fila 4 y fila 5). Otros paneles en la Figura 11 y la Figura 12 muestran que otros antígenos/receptores de superficie típicos de las células NK en iPSC-CAR4v2 son similares a los encontrados en las células de control no modificadas. Estos resultados indican que las células NK derivadas de iPSC pueden exhibir la misma citotoxicidad específica de la diana que las células NK que expresan el CAR dirigido a mesotelina en la Figura 9 y la Figura 10.

Un polinucleótido que codifica una construcción del CAR de NK puede introducirse en una célula NK o iPSC mediante el uso de métodos de transfección convencionales. Por lo tanto, aunque en el presente documento se describe en el contexto de una modalidad ilustrativa en la que un polinucleótido que codifica para el CAR se transfecta en las células mediante el uso de un sistema de transposón *Sleeping Beauty*, las células NK (y/o iPSC) pueden modificarse mediante el uso de cualquier método de transfección adecuado. La Figura 14 ilustra una construcción de un vector ilustrativo que puede usarse para modificar las células NK (y/o iPSC) para expresar un receptor de antígeno quimérico. La Figura 15 ilustra la construcción de un vector ilustrativo alternativo que incluye además los aisladores *chs4* en tándem (Aker y col., 2007, *Hum Gene Ther* 18 (4): 333-343), que pueden inhibir el silenciamiento del vector del CAR y, por lo tanto, mejorar la expresión del CAR en células NK e iPSC.

Las células NK y/o iPSC modificadas para expresar un receptor de antígeno quimérico descrito en el presente documento pueden formularse en una composición farmacéutica junto con un "portador" para la administración a un sujeto que tiene una afección al menos parcialmente caracterizada por células que pueden ser dianas de la citotoxicidad de NK. Como se usa en el presente documento, "portador" incluye cualquier disolvente, medio de dispersión, vehículo, recubrimiento, diluyente, agente antibacteriano y/o antifúngico, agente isotónico, agente retardador de la absorción, tampón, solución portadora, suspensión, coloide y similares. El uso de estos medios y/o agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. Los principios activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es indeseable biológicamente o de ninguna otra manera, es decir, el material puede administrarse a un individuo junto con células NK (y/o iPSC) modificadas para expresar un receptor de antígeno quimérico sin causar ningún efecto biológico indeseable o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

La composición farmacéutica puede formularse en una variedad de formas adaptadas a una ruta de administración preferida. Por lo tanto, una composición puede administrarse a través de rutas conocidas que incluyen, por ejemplo, parenteral (por ejemplo, intradérmica, transcutánea, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, etcétera) o tópica (por ejemplo, intratraqueal, intrapulmonar, etcétera). Una composición también se puede administrar a través de una liberación sostenida o retardada.

Una formulación puede presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y puede prepararse por métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Los métodos para preparar una composición con un portador farmacéuticamente aceptable incluyen el paso de llevar las células NK (y/o iPSC) modificadas para expresar un receptor de antígeno quimérico en asociación con un portador que constituye uno o más elementos accesorios. En general, una formulación puede prepararse mediante la asociación uniforme y/o íntima de las células NK (y/o iPSC) con, por ejemplo, un portador líquido.

Se puede proporcionar una composición farmacéutica que incluya las células NK (y/o iPSC) modificadas para expresar un receptor de antígeno quimérico en cualquier forma adecuada que incluya, pero no se limita a, una solución, una suspensión, una emulsión, un atomizador, un aerosol o cualquier forma de mezcla. La composición puede administrarse en la formulación con cualquier excipiente, portador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

La cantidad de células NK (y/o iPSC) modificadas para expresar un receptor de antígeno quimérico que se administra a un sujeto puede variar dependiendo de varios factores que incluyen, pero no se limitan a, el peso, la condición física y/o la edad del sujeto, si se están administrando uno o más receptores de antígeno quiméricos, y/o la vía de administración. Por lo tanto, la cantidad absoluta de células NK (y/o iPSC) incluidas en una forma de dosificación unitaria dada puede variar ampliamente y depende de factores como la especie, la edad, el peso y la condición física del sujeto, así como el método de administración. Por consiguiente, no es práctico establecer de manera general la cantidad que constituye una cantidad de células NK (y/o iPSC) modificadas para expresar un receptor de antígeno quimérico que es eficaz para todas y cada una de las aplicaciones posibles. Sin embargo, los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente la cantidad apropiada con la debida consideración de estos factores.

En algunas partes de la descripción, el método puede incluir la administración de un número suficiente de células NK (y/o iPSC) modificadas para expresar un receptor de antígeno quimérico para proporcionar una dosis, por ejemplo, desde aproximadamente  $10^5$  células/kg hasta aproximadamente  $10^{10}$  células/kg al sujeto, aunque en algunas partes de la descripción los métodos se pueden realizar mediante la administración de una cantidad de células NK (y/o iPSC) en una dosis fuera de este intervalo. En algunas de estas partes de la descripción, el método incluye administrar suficientes células NK (y/o iPSC) modificadas para expresar un receptor de antígeno quimérico para proporcionar una dosis desde

aproximadamente  $10^7$  células/kg hasta aproximadamente  $10^8$  células/kg al sujeto, por ejemplo, una dosis desde aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/kg hasta aproximadamente  $8 \times 10^7$  células/kg.

5 Alternativamente, la dosis se puede calcular con el uso del peso corporal real obtenido justo antes del comienzo de un ciclo de tratamiento. Para las dosificaciones calculadas de esta manera, el área de superficie corporal ( $m^2$ ) se calcula antes del comienzo del ciclo de tratamiento mediante el uso del método de Dubois:  $m^2 = (\text{peso kg}^{0.425} \times \text{altura cm}^{0.725}) \times 0,007184$ .

10 En algunas partes de la descripción, la composición farmacéutica que incluye las células NK (y/o iPSC) modificadas para expresar un receptor de antígeno quimérico puede administrarse, por ejemplo, desde una dosis única a dosis múltiples por semana, aunque en algunas partes de la descripción, el método se puede realizar mediante la administración de la composición farmacéutica a una frecuencia fuera de este intervalo. En ciertas partes de la descripción, la composición farmacéutica se puede administrar desde aproximadamente una vez al mes hasta aproximadamente cinco veces por semana.

15 En general, la composición farmacéutica se administra a un sujeto en una cantidad y en un régimen de dosificación eficaz para reducir, limitar la progresión, aliviar o resolver, en cualquier medida, los síntomas o signos clínicos de la afección. Como se usa en el presente documento, "aliviar" se refiere a cualquier reducción en la extensión, gravedad, frecuencia y/o probabilidad de un síntoma o signo clínico característico de una afección particular. "Síntoma" se refiere a cualquier evidencia subjetiva de la enfermedad o de la condición de un paciente. "Signo" o "signo clínico" se refiere a un hallazgo físico objetivo relacionado con una afección particular que puede ser encontrado por otro que no sea el paciente.

20 En la descripción anterior, se pueden describir modalidades particulares de forma aislada para mayor claridad. A menos que se especifique expresamente lo contrario que las características de una modalidad particular son incompatibles con las características de otra modalidad, ciertas modalidades pueden incluir una combinación de características compatibles descritas en el presente documento en relación con una o más modalidades.

25 Para cualquier método descrito en el presente documento que incluya etapas discretas, las etapas pueden realizarse en cualquier orden factible. Y, según corresponda, cualquier combinación de dos o más etapas puede realizarse simultáneamente.

30 Como se usa en este documento, el término "y/o" significa uno o todos los elementos enumerados o una combinación de dos o más de los elementos enumerados; los términos "comprende" y sus variaciones no tienen un significado limitante donde estos términos aparecen en la descripción y las reivindicaciones; a menos que se especifique lo contrario, "un", "una", "el/la" y "al menos uno" se usan indistintamente y significan uno o más de uno; y la mención de intervalos numéricos por puntos finales incluyen todos los números incluidos dentro de ese intervalo (por ejemplo, 1 a 5 incluye 1; 1,5, 2; 2,75; 3; 3,80; 4; 5; etcétera).

35 En el caso de que exista alguna inconsistencia entre la descripción de la presente solicitud y la(s) descripción(es) de cualquier documento mencionado en el presente documento, prevalecerá la descripción de la presente solicitud. La descripción detallada y los ejemplos anteriores se han proporcionado únicamente para mayor claridad. No se deben entender limitaciones innecesarias de ahí. La invención no se limita a los detalles exactos mostrados y descritos, sino que está definida por las reivindicaciones.

40 A menos que se indique lo contrario, deben entenderse que todos los números que expresan cantidades de componentes, pesos moleculares, y así sucesivamente, utilizados en la descripción y las reivindicaciones están modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la descripción y las reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar en dependencia de las propiedades deseadas que se pretenden obtener mediante la presente invención. Por lo menos, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos informados y mediante la aplicación de técnicas de redondeo ordinarias.

45 A pesar de que los intervalos y parámetros numéricos en este documento son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se informan con la mayor precisión posible. Todos los valores numéricos, sin embargo, contienen inherentemente un intervalo necesariamente resultante de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de prueba.

50 Todos los encabezados son para conveniencia del lector y no deben usarse para limitar el significado del texto que sigue al encabezado, a menos que así se especifique.

# REIVINDICACIONES

1. Un receptor de antígeno quimérico que comprende:  
5           un ectodominio que comprende una región de reconocimiento de antígeno;  
          un dominio transmembrana unido al ectodominio, en donde el dominio transmembrana comprende una región  
          transmembrana de NKG2D en orientación inversa; y  
          un endodominio unido al dominio transmembrana, en donde el endodominio comprende al menos un dominio  
10          de señalización que activa una célula NK.
2. El receptor de antígeno quimérico de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el dominio de reconocimiento de  
          antígeno se une específicamente a un antígeno asociado con una enfermedad.
3. El receptor de antígeno quimérico de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el dominio de reconocimiento de  
15          antígeno se une específicamente a un antígeno tumoral.
4. El receptor de antígeno quimérico de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en donde el ectodominio  
          comprende además un péptido señal o secuencia líder.
- 20   5. El receptor de antígeno quimérico de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en donde el ectodominio  
          comprende además un separador.
6. El receptor de antígeno quimérico de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en donde al menos un  
25          dominio de señalización comprende una proteína adaptadora de señalización unida a la membrana de la célula  
          NK.
7. El receptor de antígeno quimérico de acuerdo con la reivindicación 6 en donde la proteína adaptadora de  
          señalización unida a la membrana de la célula NK comprende al menos una porción de 2B4 (CD244), CD137  
30          (41BB), IL21R, DAP10, DAP12 o CD3Z.
8. Una célula NK que comprende el receptor de antígeno quimérico de acuerdo con cualquiera de las  
          reivindicaciones 1-7.
9. La célula NK de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la célula NK se deriva de una iPSC que comprende el  
35          receptor de antígeno quimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
10. Una iPSC que comprende el receptor de antígeno quimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones  
          1-7.
- 40   11. Una composición farmacéutica que comprende la célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10.
12. Una composición farmacéutica que comprende la célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10  
          para su uso en la provisión de inmunoterapia a un sujeto que tiene una afección en donde el receptor de antígeno  
45          quimérico comprende una región de reconocimiento de antígeno que se une específicamente a un antígeno  
          asociado con la afección.

Figura 1

A

| Receptor ( <i>ligando</i> )  | Degranulación   | Polarización    | Muerte |
|------------------------------|-----------------|-----------------|--------|
| NKG2D ( <i>ULBP1</i> )       | No              | No              | No     |
| 2B4 ( <i>CD48</i> )          | No              | No              | No     |
| NKG2D + 2B4                  | Sí <sup>a</sup> | No              | No     |
| LFA-1 ( <i>ICAM-1</i> )      | No              | Sí <sup>b</sup> | No     |
| NKG2D + 2B4 + LFA-1          | Sí              | Sí              | Sí     |
| CD 16 ( <i>IgG anti-S2</i> ) | Sí              | No              | No     |
| CD16 + LFA-1                 | Sí              | Sí              | Sí     |

B

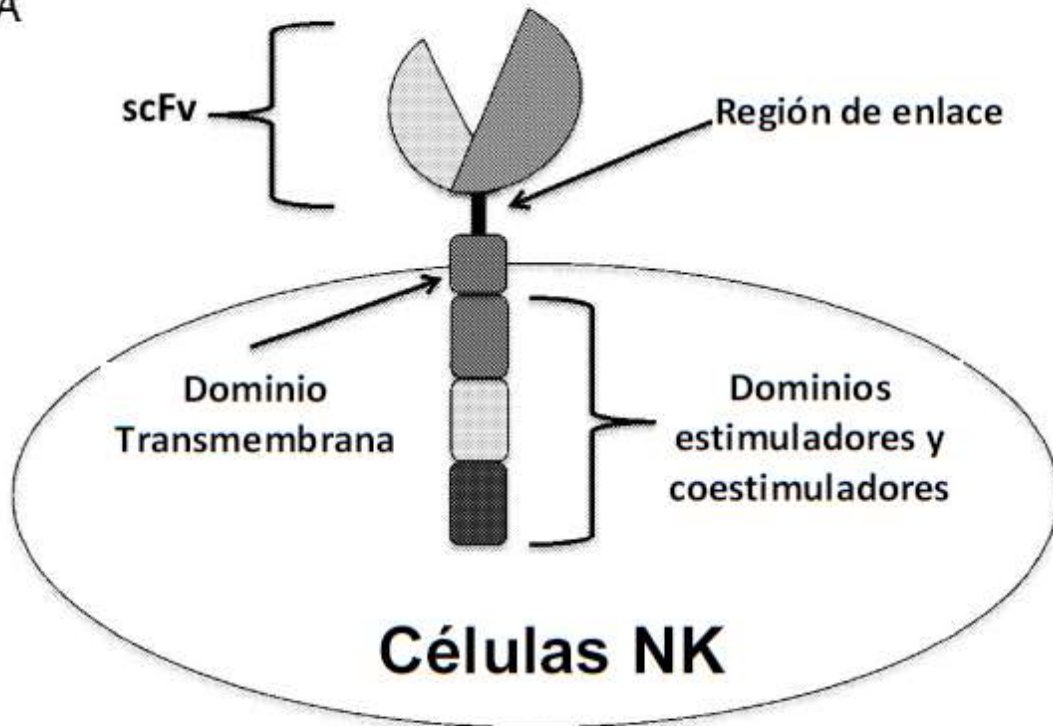
| Receptor     | Adaptador de señalización  | Motivo de señalización                                                              |
|--------------|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| CD16 o NKp46 | CD3 $\zeta$ o FcR $\gamma$ | Funcionan como dímeros;<br>CD3 $\zeta$ utiliza 3 ITAM;<br>FcR $\gamma$ tiene 1 ITAM |
| NKp44        | DAP12                      | Homodímero; 1 ITAM                                                                  |
| NKG2D        | DAP10                      | Motivo YxxM                                                                         |
| 2B4          | Ninguno                    | Contiene 4 ITSM                                                                     |

C



Figura 2

A



B

CAR 1

|                                      |                         |         |         |                          |
|--------------------------------------|-------------------------|---------|---------|--------------------------|
| Líder de CD8 $\alpha$ scFv Anti-Meso | Bisagra de CD8 $\alpha$ | CD16 TM | 2B4 ICD | Señalización CD3 $\zeta$ |
|--------------------------------------|-------------------------|---------|---------|--------------------------|

CAR 2

|                                      |                         |          |       |                          |
|--------------------------------------|-------------------------|----------|-------|--------------------------|
| Líder de CD8 $\alpha$ scFv Anti-Meso | Bisagra de CD8 $\alpha$ | NKp44 TM | DAP10 | Señalización CD3 $\zeta$ |
|--------------------------------------|-------------------------|----------|-------|--------------------------|

CAR 3

|                                      |                         |          |         |                    |
|--------------------------------------|-------------------------|----------|---------|--------------------|
| Líder de CD8 $\alpha$ scFv Anti-Meso | Bisagra de CD8 $\alpha$ | NKp46 TM | 2B4 ICD | Señalización DAP12 |
|--------------------------------------|-------------------------|----------|---------|--------------------|

CAR 4

|                                      |                         |              |         |                          |
|--------------------------------------|-------------------------|--------------|---------|--------------------------|
| Líder de CD8 $\alpha$ scFv Anti-Meso | Bisagra de CD8 $\alpha$ | NKG2D Rev TM | 2B4 ICD | Señalización CD3 $\zeta$ |
|--------------------------------------|-------------------------|--------------|---------|--------------------------|

Figura 3

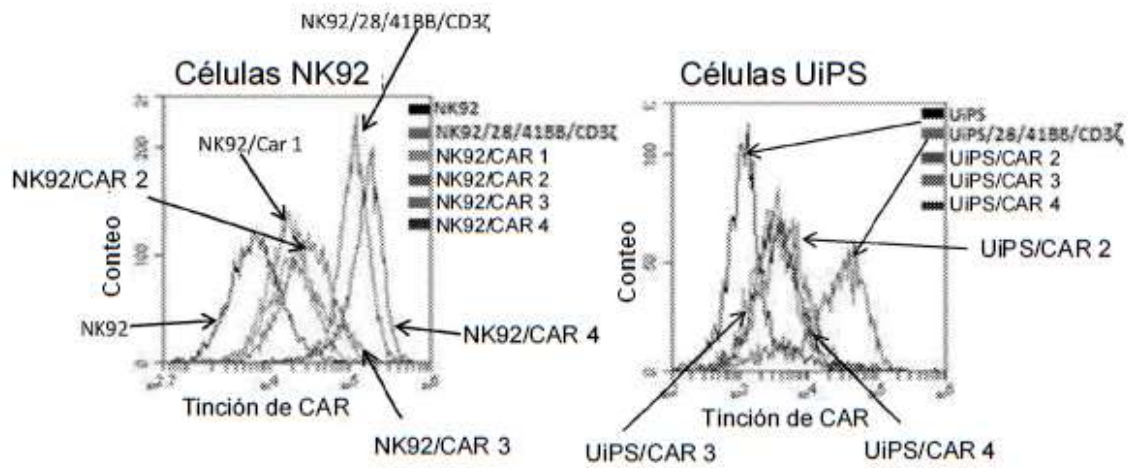


Figura 4

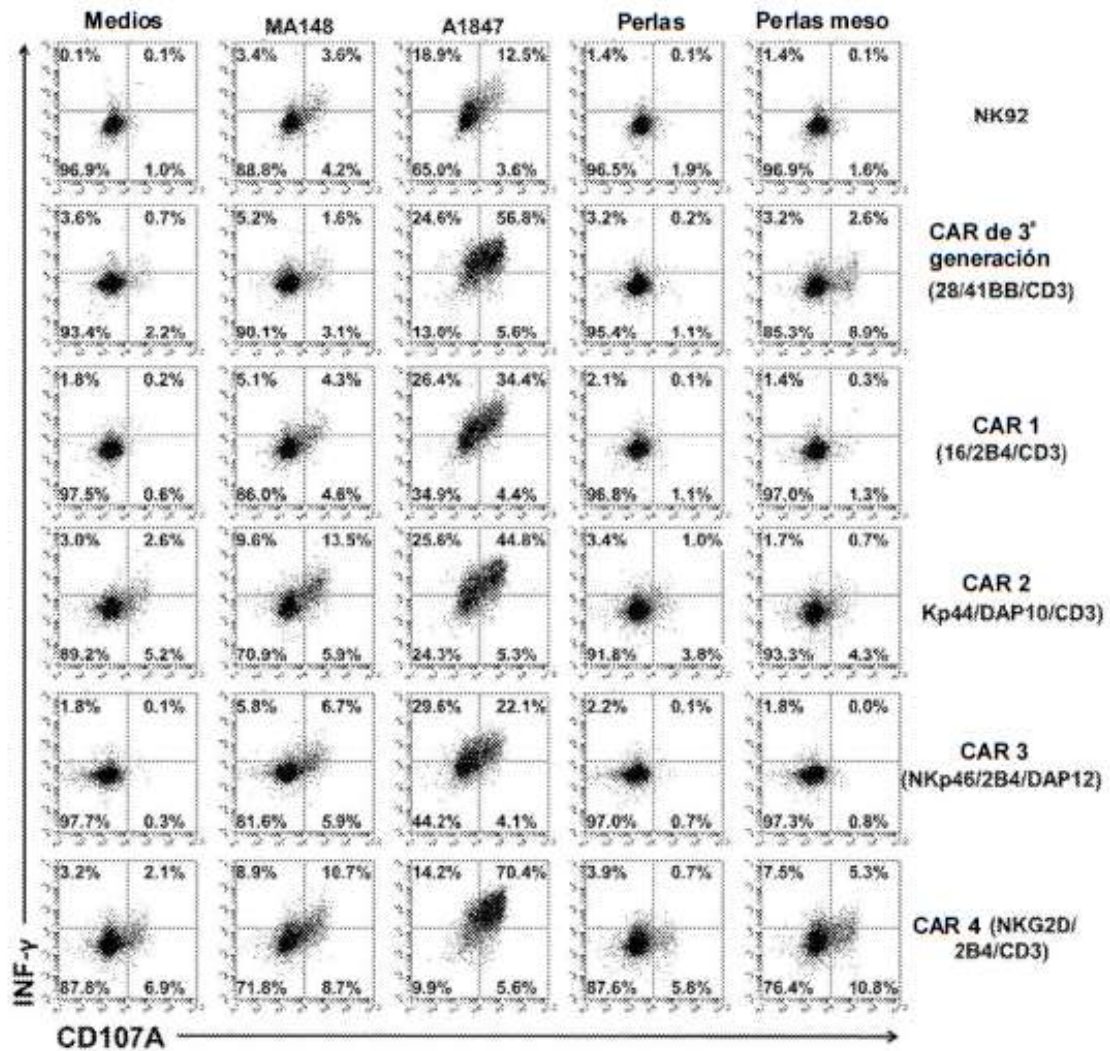


Figura 5

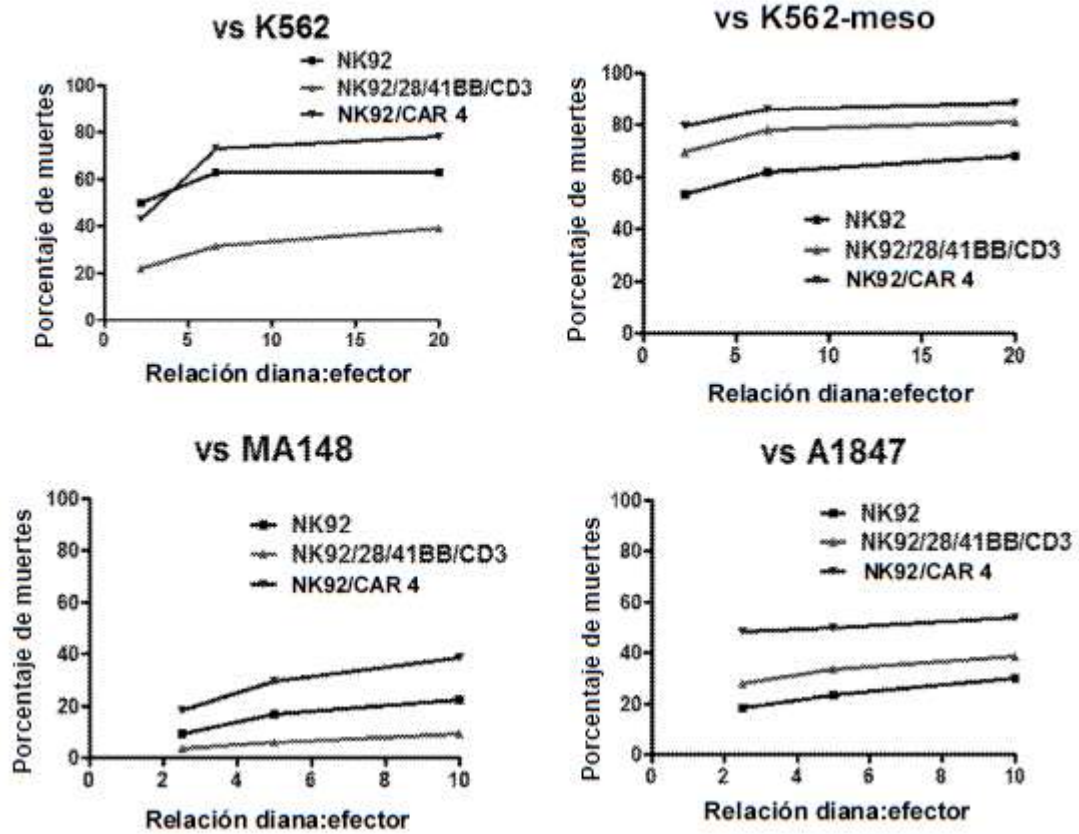


Figura 6

CAR 5 (NKG2D/41BB/CD3)

|                              |                 |              |          |      |
|------------------------------|-----------------|--------------|----------|------|
| Líder de CD8α scFv Anti-Meso | Bisagra de CD8α | NKG2D Rev TM | 41BB ICD | CD3ζ |
|------------------------------|-----------------|--------------|----------|------|

CAR 6 (NKG2D/2B4/DAP12/CD3)

|                              |                 |              |         |       |      |
|------------------------------|-----------------|--------------|---------|-------|------|
| Líder de CD8α scFv Anti-Meso | Bisagra de CD8α | NKG2D Rev TM | 2B4 ICD | DAP12 | CD3ζ |
|------------------------------|-----------------|--------------|---------|-------|------|

CAR 7 (NKG2D/2B4/DAP10/CD3)

|                              |                 |              |         |       |      |
|------------------------------|-----------------|--------------|---------|-------|------|
| Líder de CD8α scFv Anti-Meso | Bisagra de CD8α | NKG2D Rev TM | 2B4 ICD | DAP10 | CD3ζ |
|------------------------------|-----------------|--------------|---------|-------|------|

CAR 8 (NKG2D/IL21R/CD3)

|                              |                 |              |           |      |
|------------------------------|-----------------|--------------|-----------|------|
| Líder de CD8α scFv Anti-Meso | Bisagra de CD8α | NKG2D Rev TM | IL21R ICD | CD3ζ |
|------------------------------|-----------------|--------------|-----------|------|

CAR 9 (NKG2D/41BB /2B4/CD3)

|                              |                 |              |          |         |      |
|------------------------------|-----------------|--------------|----------|---------|------|
| Líder de CD8α scFv Anti-Meso | Bisagra de CD8α | NKG2D Rev TM | 41BB ICD | 2B4 ICD | CD3ζ |
|------------------------------|-----------------|--------------|----------|---------|------|

Figura 7

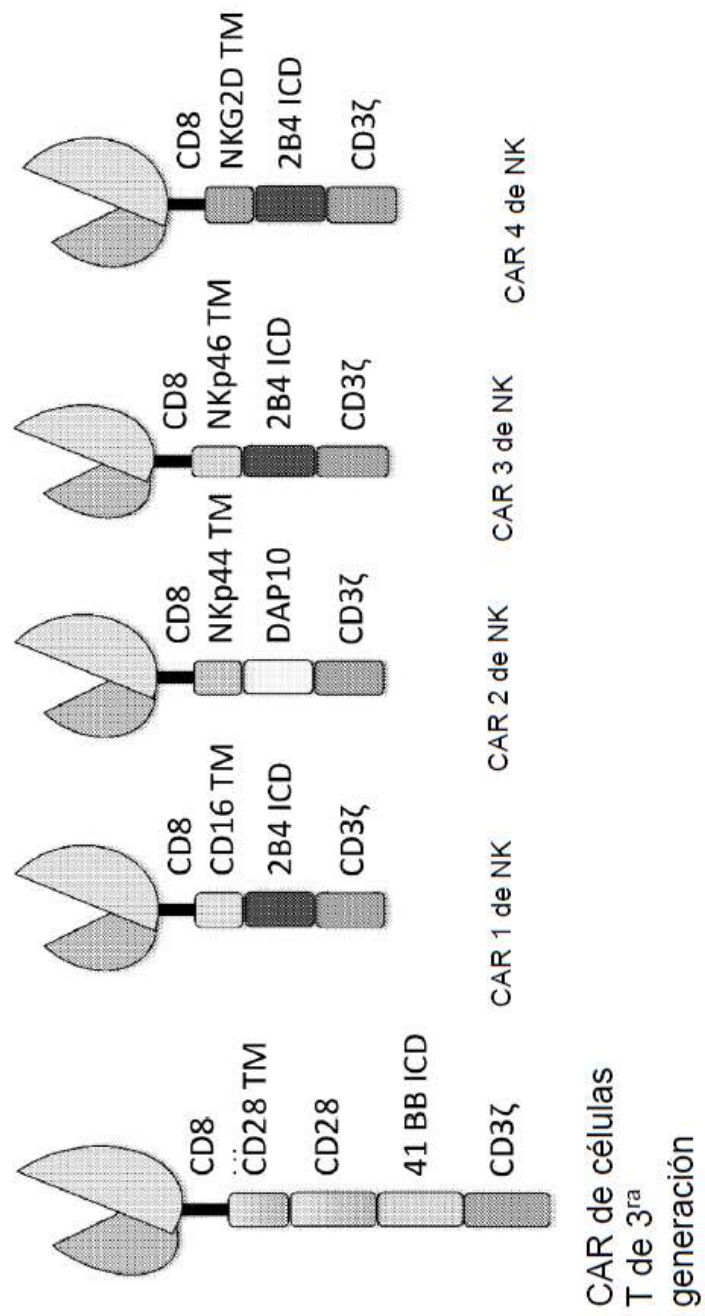


Figura 8

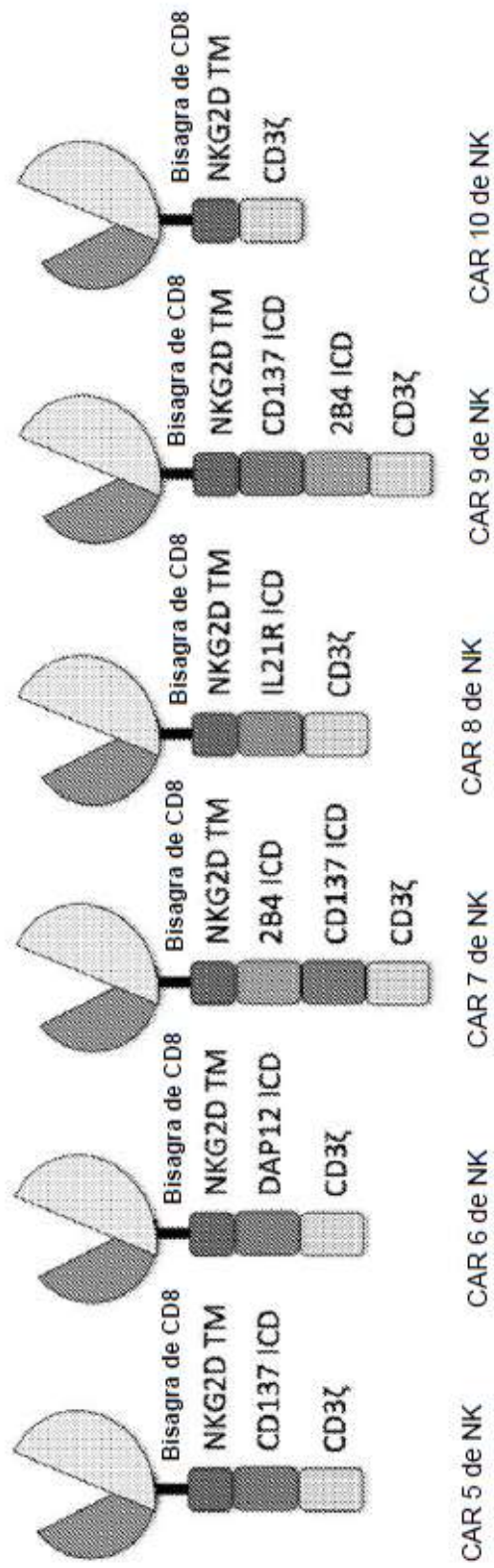


Figura 9

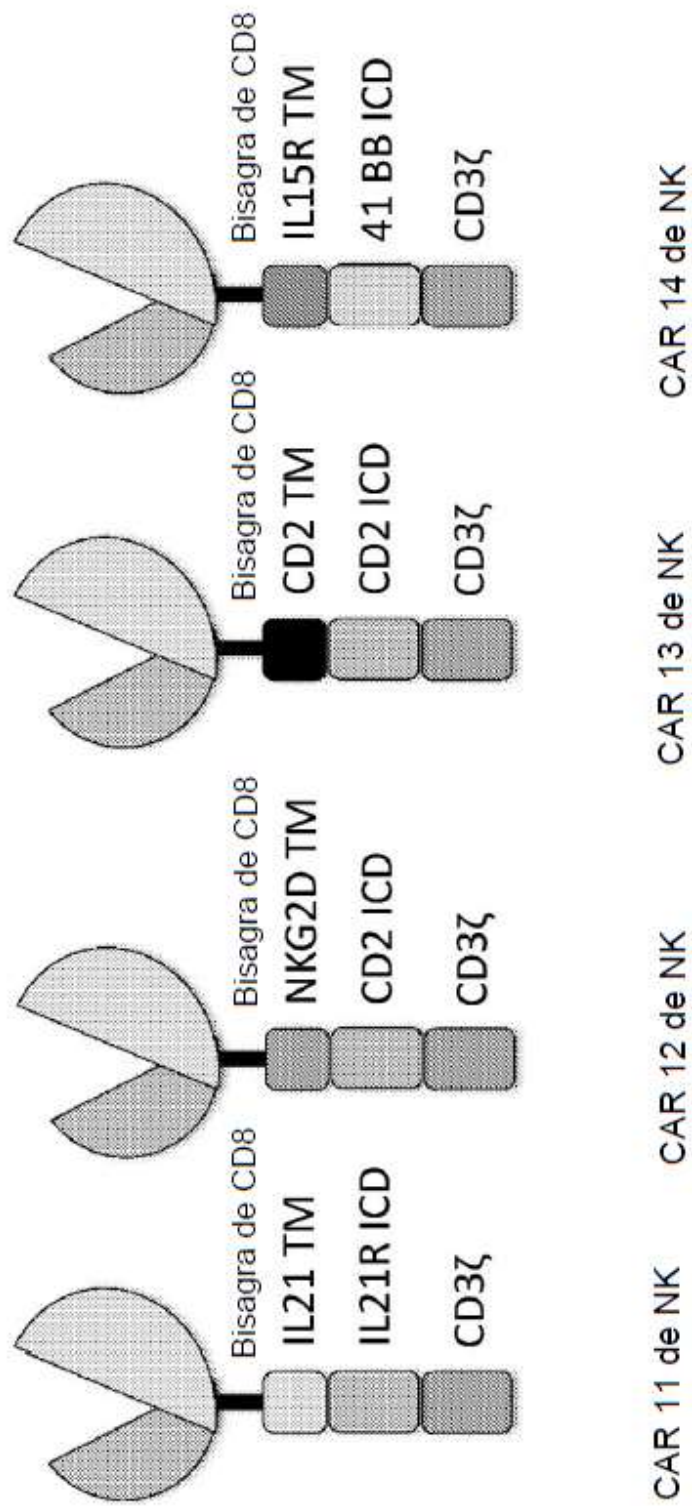


Figura 10

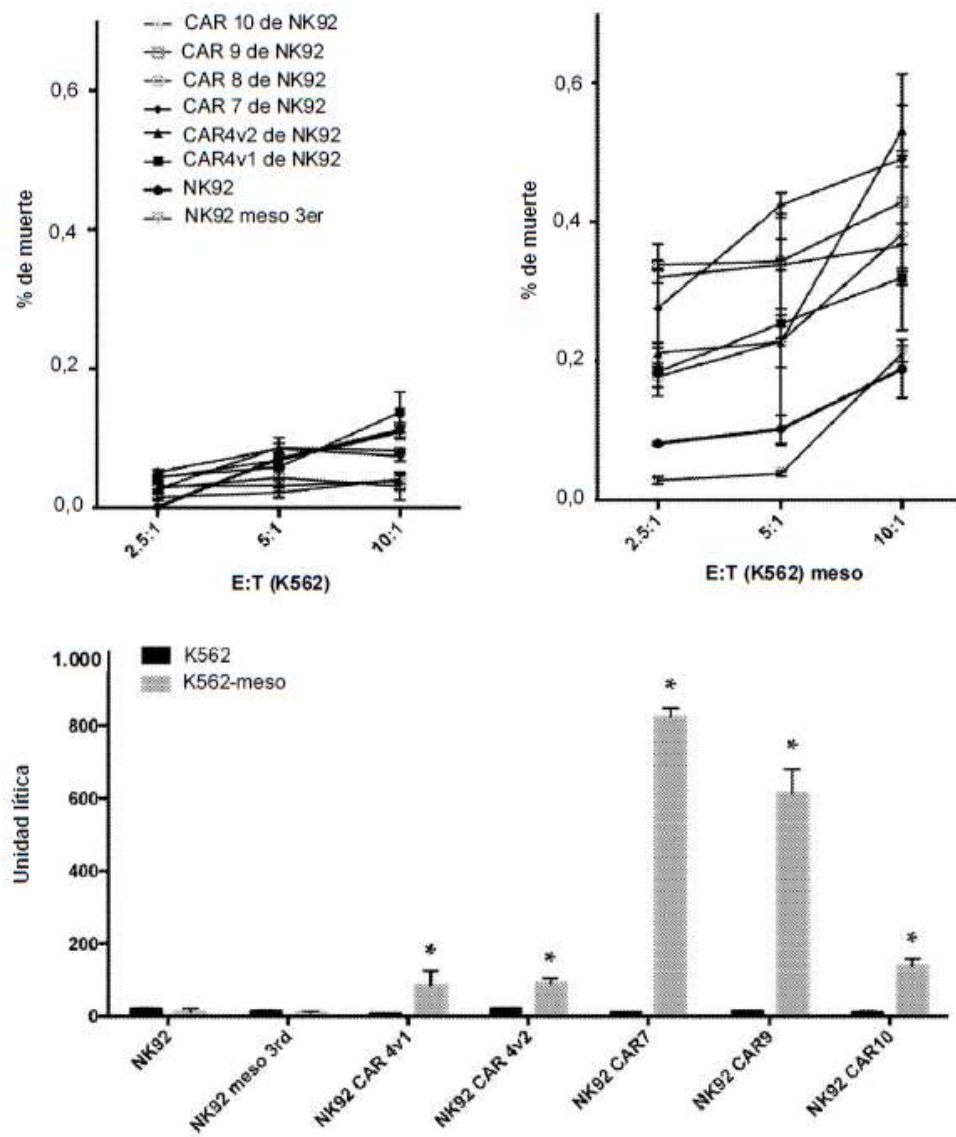
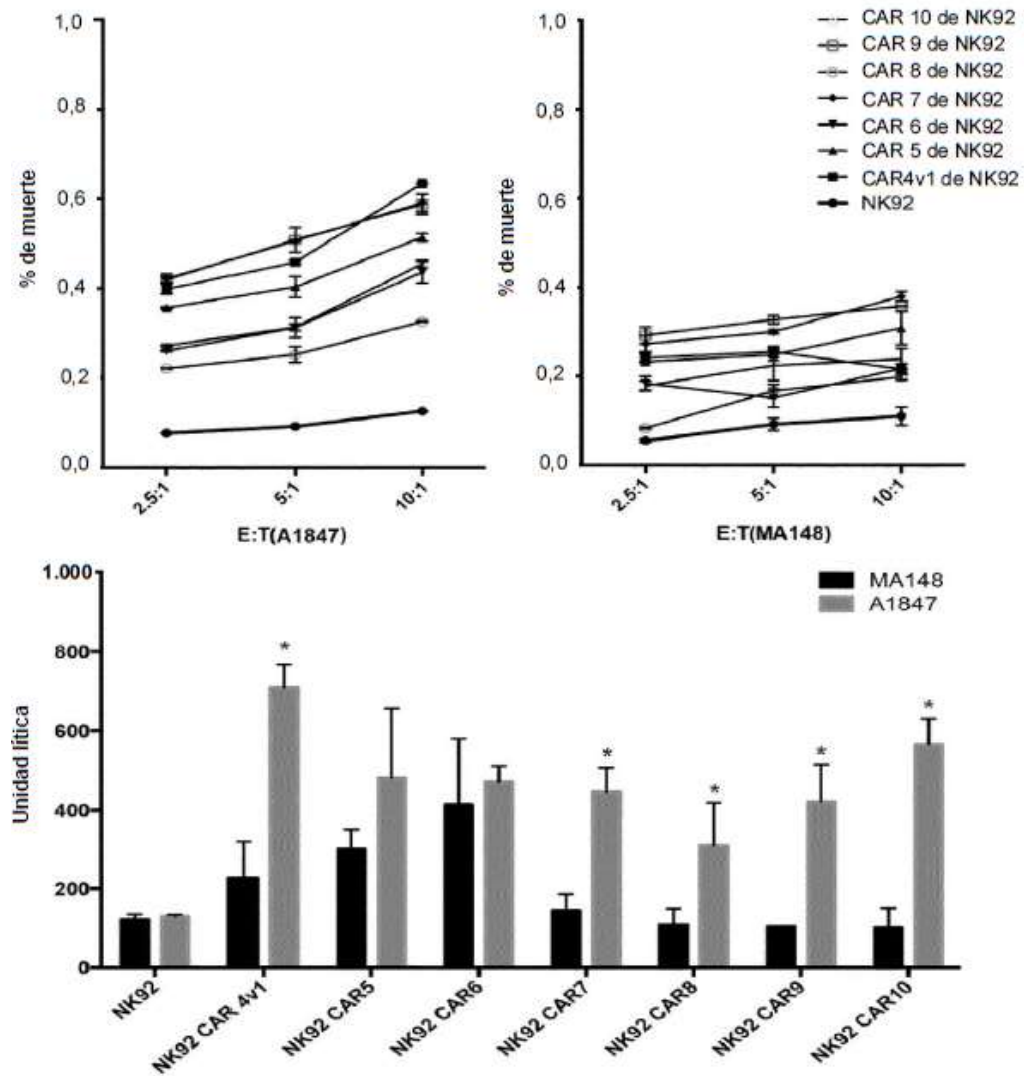


Figura 11



Nota: Las unidades líticas se calculan como se describe en Bryant y col., 1992, *J Immunol Methods* 146 (1): 91-103, sobre la base del número de células efectoras requeridas para lisar el 20 % de  $2 \times 10^4$  células diana.

\* indica  $P < 0,01$ .

Figura 12

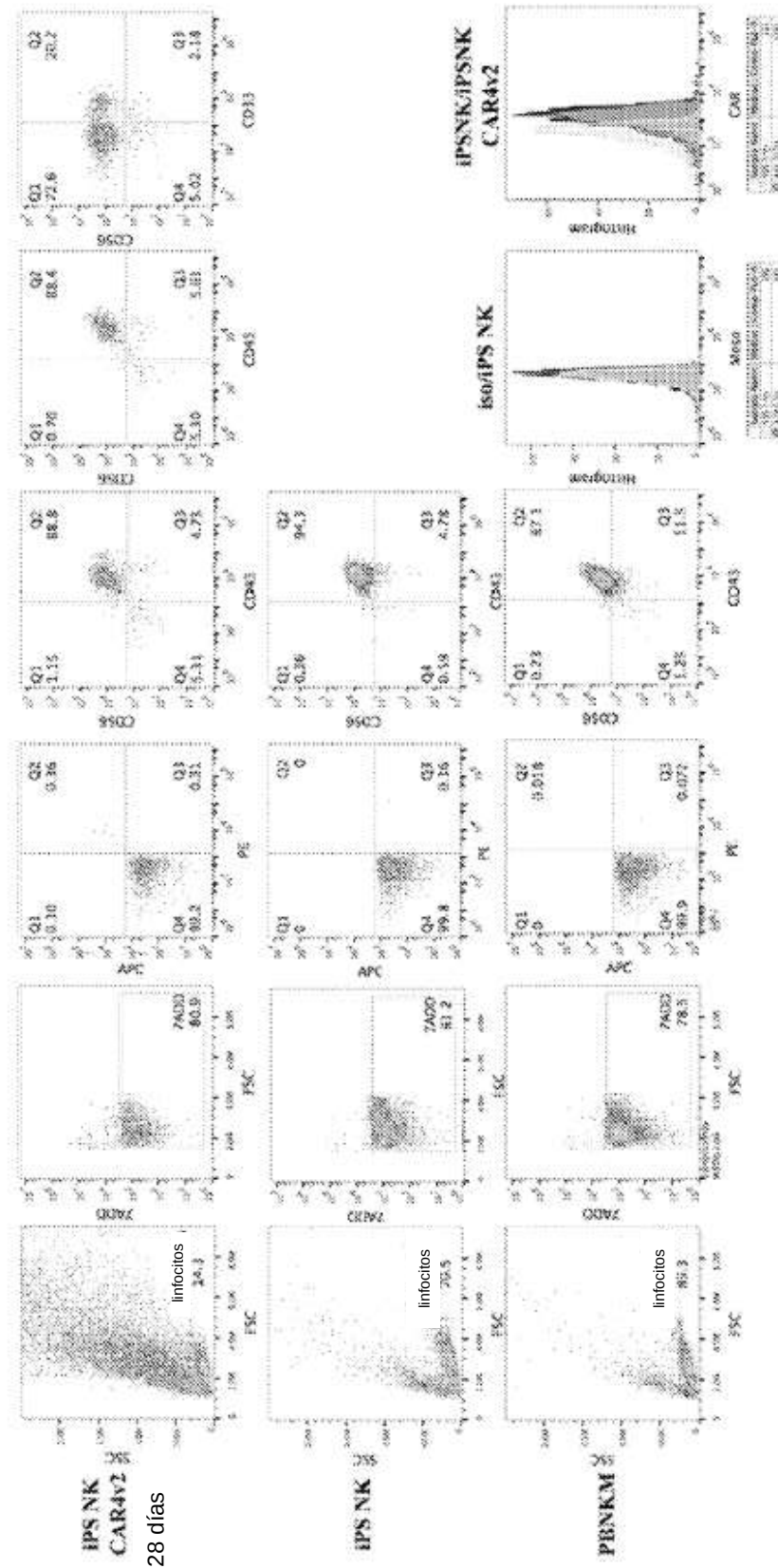


Figura 13

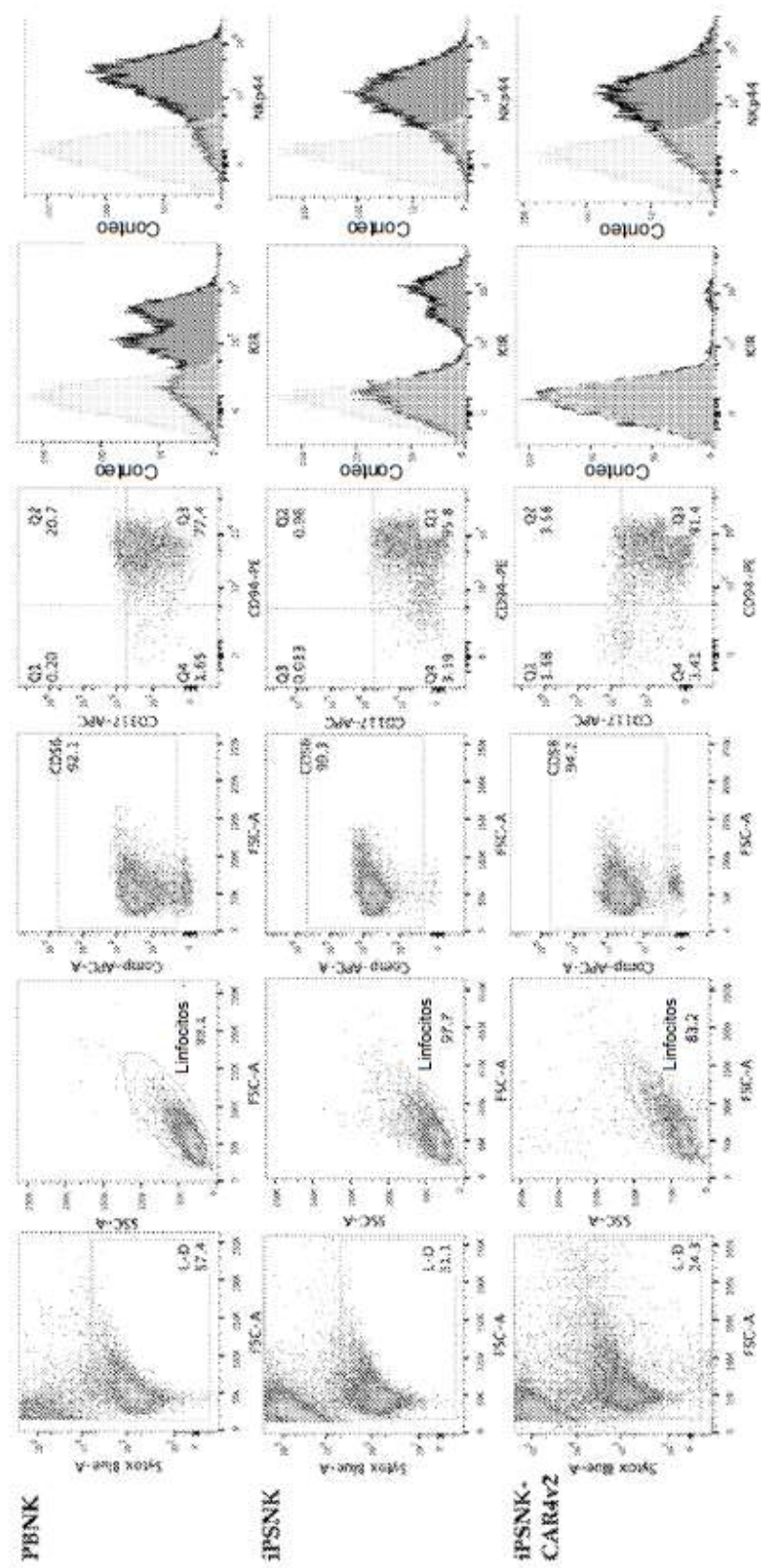


Figura 13 (Continuación)

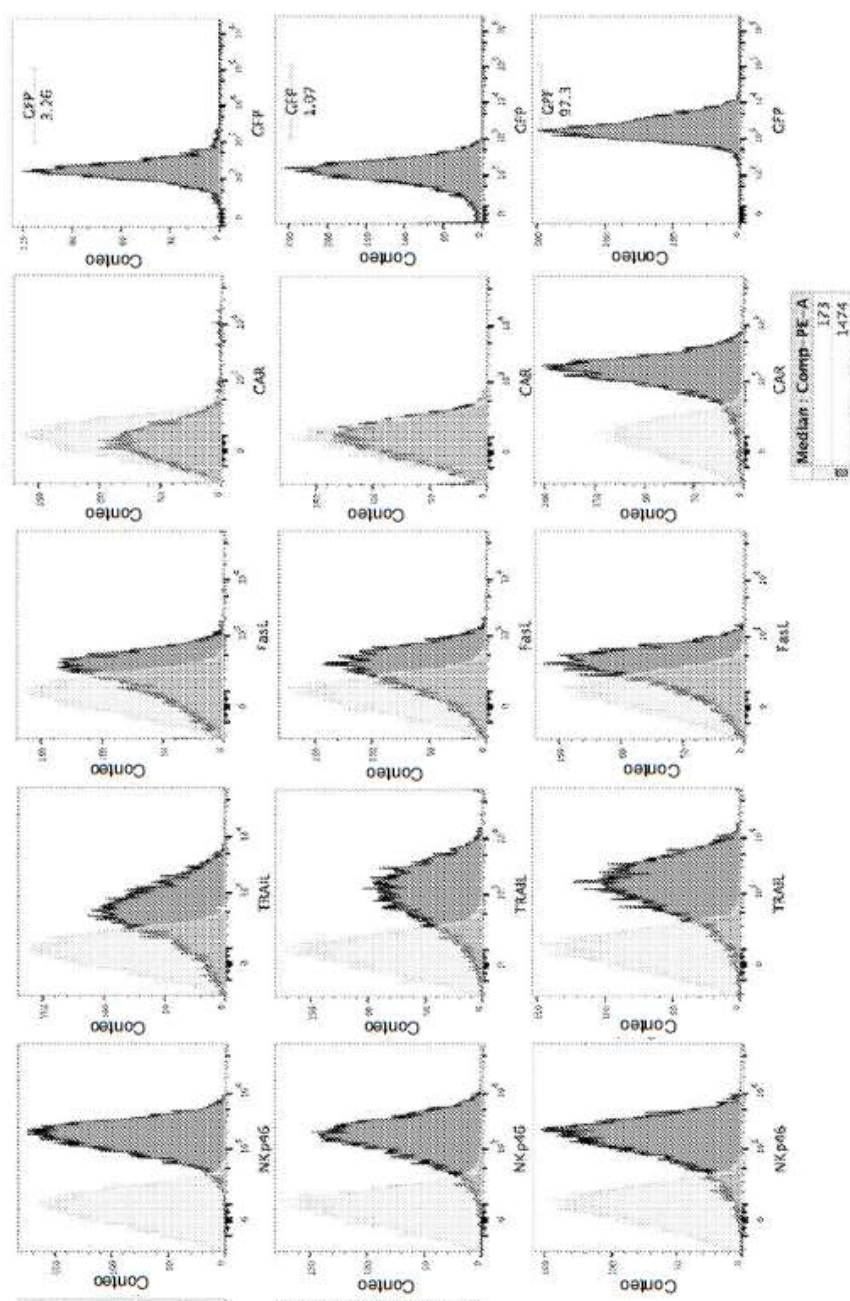


Figura 14

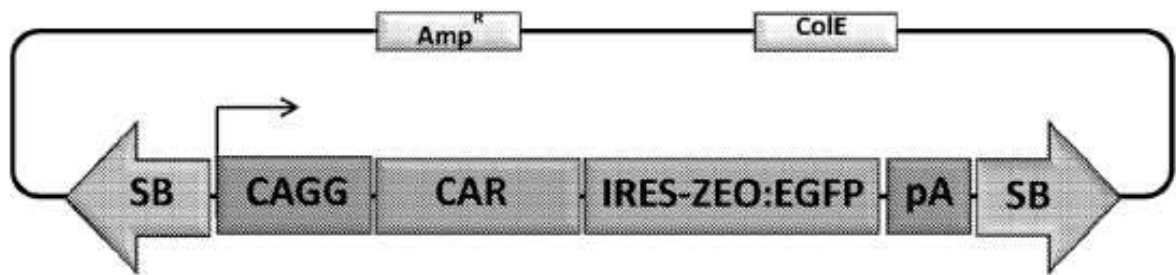


Figura 15

