

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 716**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/4188 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2011 PCT/US2011/064808**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012 WO12082841**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2011 E 11849221 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 2651442**

54 Título: **Células T que expresan al receptor de antígeno quimérico antietiqueta universal y métodos para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

14.12.2010 US 422681 P

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

05.11.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MARYLAND, BALTIMORE
(100.0%)
620 West Lexington Street, 4th Floor
Baltimore, MD 21201, US**

72 Inventor/es:

**DAVILA, EDUARDO y
TAMADA, KOJI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 791 716 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células T que expresan al receptor de antígeno quimérico anti-etiqueta universal y métodos para el tratamiento del cáncer

Campo técnico

La invención se refiere al uso de agentes terapéuticos anticancerígenos basados en células T en el tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención

La capacidad de elaborar un sistema universal pero versátil para generar células T que sean capaces de reconocer varios tipos de cánceres tiene implicaciones clínicas importantes para el uso de terapias basadas en células T. Una estrategia actual incorpora el uso de la ingeniería genética para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) en las células T. El dominio extracelular de un CAR típico consiste en los dominios V_H y V_L, variable de fragmento de cadena sencilla (scFv), de los sitios de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal. El scFv está vinculado a un dominio transmembrana flexible seguido de un motivo de activación basado en tirosina tal como aquel de CD3ζ (Sadelain et al., Curr. Opin. Immunol. 21, 215-223 (2009); Gross et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 10024-10028 (1989); Ertl et al., Cancer Res. 71, 3175-3181 (2011)). Los denominados CAR de segunda y tercera generación incluyen dominios de activación adicionales de moléculas coestimuladoras tal como CD28 y CD137 (41BB) que sirven para mejorar la supervivencia y proliferación de células T. Las células T CAR ofrecen la oportunidad de buscar y destruir células cancerosas al reconocer los antígenos asociados a tumores (TAA) expresados en su superficie (Sadelain et al., Curr. Opin. Immunol. 21, 215-223 (2009)). Como tal, el reconocimiento de una célula tumoral se produce a través de un mecanismo independiente del MHC. Varios ensayos preclínicos y clínicos de fase temprana destacan la eficacia de las células T CAR para tratar a pacientes con cáncer con tumores sólidos y neoplasias hematopoyéticas (Kershaw et al., Clin. Cancer Res. 12, 6106-6115 (2006); Lamers et al., J. Clin. Oncol. 24, e20-e22 (2006); Morgan et al., Mol. Ther. 18, 843-851 (2010); Pule et al., Nat. Med. 14, 1264-1270 (2008); Till et al., Blood 112, 2261-2271 (2008)).

A pesar de la promesa que podrían tener las células T CAR en el tratamiento de pacientes con cáncer, existen varias limitaciones para la aplicación clínica generalizada de las células T CAR. Primero, dado que ningún antígeno tumoral individual es universalmente expresado por todos los tipos de cáncer, se debe construir scFv en CAR para cada antígeno tumoral a ser atacado. En segundo lugar, el costo financiero y las tareas intensivas en mano de obra asociadas con la identificación y modificación de los scFvs contra una variedad de antígenos tumorales plantea un desafío importante. En tercer lugar, los antígenos tumorales atacados por CAR podrían ser subregulados o mutados en respuesta al tratamiento que resulta en la evasión tumoral. Como las células T CAR actuales solo reconocen un antígeno objetivo, tales cambios en los tumores niegan los efectos terapéuticos. Por lo tanto, la generación de células T CAR capaces de reconocer múltiples antígenos tumorales es altamente deseada. Finalmente, las células T CAR reaccionan con el antígeno objetivo débilmente expresado en células no tumorales, lo que puede causar efectos adversos graves (Morgan et al., Mol. Ther. 18, 843-851 (2010)). Para evitar dicha reacción en el objetivo "fuera del tumor", se requiere el uso de scFv con mayor especificidad para el antígeno tumoral. Y aunque los estudios en curso se centran en generar métodos para apagar las células T CAR *in vivo*, este sistema aún no se ha desarrollado y podría plantear desafíos inherentes adicionales.

Por lo tanto, se necesitan modificaciones en los sistemas de células T CAR existentes que aborden y superen los obstáculos que actualmente impiden el desarrollo de los sistemas en medios efectivos de tratamiento *in vivo*.

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a un sistema de células T que expresa el receptor de antígeno quimérico anti-etiqueta (AT-CAR) universal, pero adaptable, que aborda completamente las deficiencias de los sistemas actuales. El sistema utiliza una plataforma de terapia génica para generar células inmunes capaces de reconocer varios tipos de cáncer y que tienen implicaciones clínicas amplias y valiosas para el uso de terapias basadas en células T. Como se describe en el presente documento, se ha desarrollado un sistema AT-CAR versátil que otorga especificidad a las células T para reconocer y unir proteínas etiquetadas, tales como anticuerpos.

Por ejemplo, y como se describe adicionalmente en el presente documento, se han desarrollado células T humanas que expresan αFITC-CAR que reconocen específicamente varias células cancerosas humanas cuando esas células están unidas por anticuerpos marcados con FITC reactivos al cáncer. Se muestra que la activación de las células T que expresan αFITC-CAR induce lisis objetivo eficiente, proliferación de células T y producción de citocinas/quimiocinas *in vitro* y *ex vivo*. *In vivo*, se muestra que las células T que expresan αFITC-CAR más FITC-cetuximab (Ctx) retrasan el establecimiento de tumores de cáncer de colon pero conducen a la selección de células cancerosas negativas para el antígeno asociado al tumor (TAA). Usando un modelo de tumor pancreático con expresión de TAA uniforme, se observó que las células T que expresan αFITC-CAR erradican un tumor establecido y previenen el crecimiento tumoral. Este sistema 'listo para usar' promueve la tecnología existente de CAR a través de su potencial para apuntar a varias proteínas etiquetadas en el tratamiento de pacientes con cáncer.

En ciertas realizaciones, la invención se basa en una o más formulaciones de proteínas etiquetadas y una o más poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan el receptor de antígeno quimérico antietiqueta (AT-CAR), en las que la proteína es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un antígeno asociado a tumor (TAA) y las proteínas de cada formulación de proteínas etiquetadas son iguales o diferentes y los AT-CAR de cada población de células T que expresan AT-CAR son iguales o diferentes y el AT-CAR comprende un dominio de unión a la etiqueta, un dominio transmembrana y un dominio de activación de células T, en el que las células T que expresan AT-CAR se unen a la etiqueta de las proteínas etiquetadas e inducen la muerte de las células cancerosas, para su uso en un terapia combinada para tratar el cáncer en un sujeto en el que dichas una o más formulaciones de proteínas etiquetadas y dichas una o más poblaciones de células T que expresan (AT-CAR) se administran al sujeto, tratando así el cáncer en el sujeto.

En una realización preferida, las una o más formulaciones de proteínas etiquetadas son al menos dos formulaciones de proteínas etiquetadas y las una o más poblaciones de células T son al menos dos poblaciones de células T.

En una realización alternativa, la invención proporciona el uso de una o más formulaciones de proteínas etiquetadas como se define en el presente documento y una o más poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR como se define en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar cáncer en un sujeto, en el que dicho tratamiento es mediante un método como se define en el presente documento.

En aspectos particulares de las realizaciones de la invención, la etiqueta de cada formulación de proteínas etiquetadas es igual o diferente y la etiqueta se selecciona del grupo que consiste en isotiocianato de fluoresceína (FITC), estreptavidina, biotina, histidina, dinitrofenol, complejo de proteína peridina clorofila, proteína fluorescente verde, ficoeritrina (PE), peroxidasa de rábano picante, palmitoilación, nitrosilación, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y proteína de unión a maltosa.

La proteína de cada formulación de proteínas etiquetadas es igual o diferente y la proteína es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En aspectos preferidos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es cetuximab, nimotuzumab, panitumumab, rituximab, omalizumab, tositumomab, trastuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, bevacuzimab o un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los mismos.

El AT-CAR de cada población de células T que expresan AT-CAR es igual o diferente y el AT-CAR comprende un dominio de unión a etiqueta, un dominio transmembrana y un dominio de activación de células T. En aspectos preferidos, el dominio de unión a etiqueta es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En aspectos preferidos, el dominio de unión a etiqueta se une específicamente a FITC, biotina, PE, histidina o estreptavidina. En aspectos preferidos en los que el dominio de unión a la etiqueta es un fragmento de unión a antígeno, el fragmento de unión a antígeno es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), tal como un scFv que se une específicamente a FITC, biotina, PE, histidina o estreptavidina. En aspectos preferidos, el dominio transmembrana es la bisagra y las regiones transmembrana de la cadena de CD8 α humana. En aspectos preferidos, el dominio de activación comprende una o más de la región citoplasmática de CD28, la región citoplasmática de CD137 (41BB), OX40, HVEM, CD3 ζ y FcR ϵ .

En aspectos particulares de las realizaciones de la invención, las células T de cada población de células T que expresan AT-CAR son iguales o diferentes y en las que las células T se seleccionan del grupo que consiste en células T de cualquier ambiente de HLA, de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células T aisladas de un explante tumoral del sujeto y células T intratumorales del sujeto.

En aspectos particulares de las realizaciones de la invención, las células T de cada población de células T que expresan AT-CAR consisten en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) HLA-A2+.

En aspectos particulares de las realizaciones de la invención, la formulación o formulaciones de proteínas etiquetadas deben administrarse al sujeto antes de la administración de la población o poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR.

En aspectos particulares de las realizaciones de la invención, la formulación o formulaciones de proteínas etiquetadas deben administrarse al sujeto simultáneamente con la administración de la población o poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR.

En aspectos particulares de las realizaciones de la invención, las formulaciones de proteínas etiquetadas deben administrarse al sujeto después de la administración de la población o poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR.

En aspectos particulares de las realizaciones de la invención, la formulación o formulaciones de proteínas etiquetadas y la población o poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR deben administrarse al sujeto en cualquier orden.

En aspectos particulares de las realizaciones de la invención, la unión de células T que expresan AT-CAR a las proteínas etiquetadas induce la activación citolítica de las células T.

En aspectos particulares de las realizaciones de la invención, el sujeto es un ser humano.

Lo anterior ha delineado de manera bastante amplia las características y ventajas técnicas de la presente invención para que la descripción detallada de la invención que sigue se pueda entender mejor. Se describirán en el presente documento características y ventajas adicionales de la invención, que constituyen el objeto de las reivindicaciones de la invención. Los expertos en la materia deben apreciar que cualquier concepción y realización específica descrita en el presente documento puede utilizarse fácilmente como base para modificar o diseñar otras formulaciones para llevar a cabo los mismos propósitos de la presente invención. Sin embargo, debe entenderse expresamente que cualquier descripción, figura, ejemplo, etc., se proporciona únicamente con fines ilustrativos y descriptivos y de ninguna manera pretende definir los límites de la invención.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Expresión, caracterización y funcionalidad *in vitro* de anti-FITC-CAR. (A) Diagrama del anti-FITC-CAR (α FITC-CAR). El diagrama en cajones a la izquierda muestra los elementos genéticos incluidos en el polinucleótido modificado para expresar α FITC-CAR, comenzando con una repetición terminal larga 5' y seguida por la región de codificación para scFv anti-FITC, dominio transmembrana de CD28, CD28, 41BB, cadena zeta (ζ) y una repetición terminal larga 3'. La figura a la derecha muestra el polipéptido α FITC-CAR que atraviesa la membrana de las células T y se posiciona para unirse a un anticuerpo reactivo del tumor marcado con FITC. (B) Las PBMC de HLA-A2+ se activaron con anticuerpos anti-CD3 en presencia de IL-2 seguido de transducción con retrovirus α FITC-CAR. La expresión de α FITC-CAR se determinó tiñendo las células con CD3 y cetuximab conjugado con FITC (FITC-Ctx) o perlas de dextrano conjugadas con FITC (FITC-Dex). Cetuximab es un anticuerpo con especificidad de unión para células tumorales que expresan EGFR. (C) Se examinó la funcionalidad de α FITC-CAR en células T transducidas y de control en ensayos de proliferación usando FITC-Ctx, FITC-Dex o Ctx unidos a una placa. (D) La proliferación de células T α FITC-CAR y células T de control se midió en respuesta a la estimulación con células de cáncer de colon SW480 teñidas con concentraciones valorantes de FITC-Ctx. (E) La citotoxicidad de las células T por α FITC-CAR y las células T de control se midieron frente a células de cáncer de colon SW480 teñidas con FITC-Ctx o FITC-IgG de ratón. (F) la citotoxicidad de α FITC-CAR se midió frente a Panc 6.03 teñido con anticuerpos Ctx y Her2 no marcados o teñido con FITC-Ctx o FITC-Her2 en diversas relaciones de efector con respecto al objetivo. Alternativamente, las células de cáncer de mama AU565 se tiñeron con FITC-Her2 o mAb Her2 no marcado. Todos los datos son representativos de tres o más experimentos independientes, cada uno con tendencias idénticas.

Figura 2. Las células T α FITC-CAR retrasan el establecimiento del tumor pero promueven el crecimiento de células tumorales negativas para antígeno. (A) Las células de cáncer de colon humano SW480 se inyectaron por vía subcutánea en ratones NSG seguido de inyección con FITC-Ctx (ip) un día después. Veinticuatro horas después, se inyectaron 5×10^6 células T α FITC-CAR en la vena de la cola. FITC-Ctx se inyectó (ip) semanalmente durante tres semanas. Los datos son representativos de dos o tres experimentos (tres o más ratones por grupo). *, $P \leq 0,02$, ANOVA; ns, no significativo. (B) El porcentaje de células T positivas y negativas para CD3⁺ α FITC-CAR se determinó por citometría de flujo. Se muestra el porcentaje promedio de células T α FITC-CAR⁺ antes de la inyección o del explante tumoral de cuatro ratones. (C) Los explantes de tumor se picaron finamente y se cultivaron en tripsina durante 2 horas a 37 °C seguido de enriquecimiento de células T usando un kit de selección negativa. Las células T se cultivaron conjuntamente con células de cáncer de colon SW480 que se habían pulsado con FITC-Ctx o Ctx ($0,5 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ células). Tres días después, la proliferación se determinó por la absorción de [³H]timidina (\pm DE). (D) Alternativamente, la producción de citoquinas y quimiocinas se midió usando una matriz Milliplex 72 horas después de la estimulación. (E) La expresión de EGFR en explantes tumorales de SW480 o células SW480 tomadas de cultivo de tejido se examinó por citometría de flujo usando FITC-Ctx.

Figura 3. Las células T α FITC-CAR previenen el crecimiento tumoral y erradican los tumores establecidos. (A) La expresión de EGFR en las células de cáncer pancreático humano (Panc 6.03) se determinó mediante tinción de células con FITC-Ctx o con el anticuerpo de control FITC-mIgG y se analizó mediante citometría de flujo. (B) En el modelo de tumor profiláctico, se inyectaron células Panc 6.03 por vía subcutánea en ratones NSG ($n = 5$) seguido de inyección con FITC-Ctx (ip) un día después. Veinticuatro horas después, se inyectaron 5×10^6 células T α FITC-CAR en la vena de la cola. Se inyectaron 25 μg de FITC-Ctx o Ctx (ip) semanalmente durante tres semanas. Se muestra el crecimiento tumoral y la supervivencia del ratón. (C) En el modelo terapéutico, los tumores Panc 6.03 se cultivaron hasta tamaños entre 3-10 mm² y luego se inyectaron (ip) con 25 μg de FITC-Ctx o Ctx cada semana durante tres semanas. Un día después de la primera inyección de FITC-Ctx, a los ratones se les administraron 5×10^6 células T α FITC-CAR mediante inyección en la vena de la cola. *, $P \leq 0,02$, ANOVA; ns, no significativo.

Descripción detallada de la invención

1. Definiciones

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se usan de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar, por ejemplo, en Benjamin Lewin, Genes

VII, publicado por Oxford University Press, 2000 (ISBN 019879276X); Kendrew et al., (eds.); The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Publishers, 1994 (ISBN 0632021829); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por Wiley, John & Sons, Inc., 1995 (ISBN 0471186341); y otras referencias técnicas similares.

Como se usa en el presente documento, "un" o "uno, una" pueden significar uno o más. Como se usa en el presente documento cuando se usa junto con la palabra "que comprende", las palabras "un" o "uno, una" pueden significar uno o más de uno. Como se usa en el presente documento, "otro" puede significar al menos un segundo o más. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluyen los plurales y los términos plurales incluyen el singular.

Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" se refiere a un valor numérico, que incluye, por ejemplo, números enteros, fracciones y porcentajes, indicados explícitamente o no. El término "aproximadamente" generalmente se refiere a un intervalo de valores numéricos (por ejemplo, +/- 5-10% del valor mencionado) que un experto en la materia consideraría equivalente al valor mencionado (por ejemplo, que tiene la misma función o resultado). En algunos casos, el término "aproximadamente" puede incluir valores numéricos que se redondean a la cifra significativa más cercana.

II. La presente invención

Se ha desarrollado una generación adaptable de CAR que permite el uso generalizado de inmunoterapia personalizada basada en células T. Las células T humanas se han modificado para expresar un anti-FITC CAR-CD28-41BB-CD3 ζ (denominado α FITC-CAR). Esta plataforma aprovecha la interacción de alta afinidad entre el scFv anti-FITC (en la superficie de la célula) y FITC, así como la capacidad de conjugar de manera fácil y económica las moléculas de FITC (u otras etiquetas) con cualquier anticuerpo monoclonal anticancerígeno tal como cetuximab (anti-EGFR), rituximab (anti-CD20) y herceptina (anti-Her2) utilizados para tratar pacientes con varios tipos de cánceres. Este sistema permite una especificidad extrema para el antígeno y se acompaña de una función efectora robusta y una capacidad proliferativa sin reactividad cruzada con los "autoantígenos".

Células efectoras. Las células efectoras usadas de acuerdo con la presente invención pueden ser autólogas, singénicas o alogénicas, dependiendo la selección de la enfermedad a tratar y los medios disponibles para hacerlo. Las poblaciones adecuadas de células efectoras que pueden usarse en los métodos incluyen cualquier célula inmune con actividad citolítica, tal como las células T. Los ejemplos de subpoblaciones de células T incluyen, pero no se limitan a, las que expresan CD3⁺ incluyendo células T CD3⁺CD8⁺, células T CD3⁺CD4⁺ y células T NK. En un aspecto, las células T son células mononucleares de sangre periférica HLA-A2+ (PBMC) pero las células T pueden ser de cualquier ambiente de HLA de PBMC y utilizarse en un sistema autólogo, singénico o alogénico. Las células T también pueden aislarse de cualquier fuente, incluso de un explante tumoral del sujeto a tratar o células T intratumorales del sujeto a tratar. En aras de la conveniencia, las células efectoras se denominan comúnmente células T en el presente documento, pero debe entenderse que cualquier referencia a las células T, a menos que se indique lo contrario, es una referencia a todos los tipos de células efectoras como se define en el presente documento.

Receptor de antígeno quimérico antietiqueta (AT-CAR). El experto en la materia apreciará que el receptor de antígeno quimérico antietiqueta (AT-CAR) expresado por las células T usadas de acuerdo con la presente invención permite una gran flexibilidad. Los únicos requisitos para los AT-CAR utilizados en los métodos son (i) que el AT-CAR tenga especificidad de unión para una etiqueta particular que puede conjugarse con una proteína (un anticuerpo de acuerdo con la invención) que se une a un antígeno asociado a tumor (TAA) y (ii) que las células T se puedan modificar para expresar el AT-CAR. De acuerdo con la invención, el AT-CAR incluye un dominio de activación que induce una lisis objetivo eficiente tras la unión y activación de las células T. Una característica adicional que se prefiere, pero no se requiere, es la capacidad de reemplazar la porción de scFv del AT-CAR con uno de especificidad por otras etiquetas, tal como la biotina o la ficoeritrina, que se pueden conjugar con proteínas reactivas con el objetivo (es decir, el tumor) (un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo) para usarse *in vivo*.

El AT-CAR comprende tres dominios. El primer dominio es el dominio de unión de etiquetas. Este dominio está típicamente presente en el extremo terminal amino del polipéptido que comprende el AT-CAR. La localización del dominio de unión a la etiqueta en el extremo terminal amino permite el acceso sin restricciones del dominio de unión a la etiqueta a la proteína etiquetada que está unida a la célula objetivo. Como se usa en el presente documento, el dominio de unión a la etiqueta es típicamente un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. La identidad del anticuerpo o fragmento solo está limitada por la identidad de la etiqueta de la proteína etiquetada. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden obtener de cualquier especie de animal, aunque preferiblemente de un mamífero tal como un ser humano, simio, ratón, rata, conejo, conejillo de indias, caballo, vaca, oveja, cabra, cerdo, perro o gato. Preferiblemente los anticuerpos son anticuerpos humanos o humanizados. Tampoco hay una limitación en la clase particular de anticuerpo que se puede usar, incluidos los anticuerpos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE. Los fragmentos de anticuerpo incluyen un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab y fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, con la única limitación de que los fragmentos de anticuerpo conserven la capacidad de unirse a la etiqueta seleccionada

Los anticuerpos también pueden ser también anticuerpos policlonales, monoclonales o quiméricos, tales como cuando una región de unión a antígeno (por ejemplo, F(ab')₂ o región hipervariable) de un anticuerpo no humano se transfiere al marco de un anticuerpo humano mediante técnicas de ADN recombinante para producir una molécula sustancialmente humana. A partir de ellos pueden prepararse fragmentos de unión a antígeno, tales como scFv.

Una ventaja de los AT-CAR usados en la presente invención es que pueden producirse usando anticuerpos disponibles comercialmente. Alternativamente, se pueden producir anticuerpos para una etiqueta seleccionada. Para la producción de anticuerpos, varios huéspedes que incluyen, entre otros, cabras, conejos, ratas, ratones, humanos, etc., pueden inmunizarse mediante inyección con una proteína particular o cualquier porción, fragmento u oligopéptido que retenga las propiedades inmunogénicas de la proteína. Dependiendo de la especie huésped, se pueden usar varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Dichos adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, toxina lábil térmica desintoxicada de *E. coli*, geles minerales de Freund, tales como el hidróxido de aluminio y sustancias tensioactivas tales como la lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones en aceite, hemocianina de lapa californiana, y dinitrofenol. BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) y *Corynebacterium parvum* también son adyuvantes potencialmente útiles.

Los anticuerpos y sus fragmentos pueden prepararse usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos, tal como mediante líneas celulares continuas en cultivo para la producción de anticuerpos monoclonales. Dichas técnicas incluyen, entre otras, la técnica de hibridoma descrita originalmente por Koehler y Milstein (Nature 256: 495-497 (1975)), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kosbor et al., Immunol Today 4:72 (1983); Cote et al., Proc Natl. Acad. Sci 80: 2026-2030 (1983)), y la técnica de hibridoma del EBV (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss Inc, Nueva York NY, páginas 77-96 (1985)).

Las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", es decir, el empalme de genes de anticuerpos de ratón con genes de anticuerpos humanos para obtener una molécula con especificidad de antígeno y actividad biológica apropiadas, también se pueden usar (Morrison et al., Proc Natl Acad. Sci 81: 6851-6855 (1984); Neuberger et al., Nature 312: 604-608 (1984); Takeda et al., Nature 314: 452-454 (1985)). Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla, tal como las descritas en la patente de los Estados Unidos No. 4.946.778, se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla específicos de etiqueta.

En un ejemplo, el dominio de unión a etiqueta es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv). Un scFv comprende las regiones variables de las cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L) de un anticuerpo, típicamente unidas mediante un péptido corto de diez hasta aproximadamente 25 aminoácidos. El enlazador puede conectar el extremo terminal N de la V_H con el extremo terminal C de la V_L o viceversa.

Como se indicó anteriormente, la especificidad de unión del dominio de unión a la etiqueta dependerá de la identidad de la etiqueta que se conjuga con la proteína que se usa para unir las células objetivo. Por ejemplo, cuando la etiqueta es FITC (isotiocianato de fluoresceína), el dominio de unión a la etiqueta puede constituir un scFv anti-FITC. Alternativamente, cuando la etiqueta es biotina o PE (ficoeritrina), el dominio de unión a la etiqueta puede constituir un scFv anti-biotina o un scFv anti-PE.

El segundo dominio es un dominio transmembrana (TM). El dominio TM permite que el CAR se ancle en la membrana celular de la célula T. Los ejemplos de dominios TM incluyen, pero no se limitan a, las regiones de bisagra y transmembrana de la cadena CD8 α humana.

El tercer dominio, cuando está presente, es el dominio de activación de células T. Este dominio ayuda en la activación de las células T tras la unión del CAR a la proteína etiquetada que está unida a la célula objetivo. La activación de las células T incluye la inducción de la producción de citocinas y quimiocinas, así como la activación de la actividad citolítica de las células. Los ejemplos de dominios de activación de células T incluyen, pero sin limitarse a, las regiones citoplasmáticas de CD28, CD137 (41BB), OX40 y HVEM que sirven para mejorar la supervivencia y proliferación de células T; y CD3 ζ y FcR ϵ que inducen la activación de células T. Se puede incluir uno o más de un dominio de activación de células T en el CAR, tal como dos, tres, cuatro o más dominios de activación de células T.

Producción de células T AT-CAR. Las células T se pueden modificar para expresar AT-CAR por medios fácilmente conocidos por el experto en la materia. En general, se construye un vector polinucleotídico que codifica el AT-CAR y el vector se transfecta en una población de células T. Luego, las células crecen en condiciones que promueven la expresión de AT-CAR por las células T. La transfección exitosa (o transducción que se refiere a la integración génica mediada por virus) y la presentación de AT-CAR por las células T se realiza a través de medios convencionales, algunos de los cuales se describen en los Ejemplos de la presente memoria.

En un aspecto, las células T pueden modificarse para producir AT-CAR construyendo primero un vector retroviral que codifique un AT-CAR seleccionado. Un ejemplo de vector retroviral incluye, pero no se limita a, el esqueleto del vector pMSGV1-CD8-28BBZ, que se deriva del pMSGV (vector de empalme basado en el virus de células madre murinas). La secuenciación de ADN se puede usar para confirmar la construcción adecuada del vector antes de la transfección de las células T. La transducción retroviral se puede realizar utilizando técnicas conocidas, tal como la de Johnson et al., (Blood 114, 535-546 (2009)). La expresión superficial de AT-CAR en células T transducidas puede determinarse,

por ejemplo, mediante citometría de flujo después de tñir las células con proteína conjugada con etiqueta o perlas de dextrano conjugadas con etiqueta. La porción de etiqueta de la proteína o las perlas estará unida por el dominio de unión a la etiqueta de CAR expresado por las células.

5 Administración de células T AT-CAR. Las poblaciones de células T que expresan AT-CAR pueden formularse para la administración a un sujeto usando técnicas conocidas por el experto en la materia. Las formulaciones que comprenden poblaciones de células T que expresan AT-CAR pueden incluir excipiente o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes incluidos en las formulaciones tendrán diferentes propósitos dependiendo, por ejemplo, de la naturaleza del dominio de unión a la etiqueta que comprende el AT-CAR, la subpoblación de células T utilizadas y el modo de administración. Los ejemplos de excipientes generalmente utilizados incluyen, sin limitación: solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua para inyección, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos, agentes estabilizantes, agentes solubilizantes y tensioactivos, tampones y conservantes, agentes de tonicidad, agentes de carga y agentes lubricantes. Las formulaciones que comprenden poblaciones de células T que expresan AT-CAR típicamente se habrán preparado y cultivado en ausencia de componentes no humanos, tales como suero animal (por ejemplo, albúmina de suero bovino).

Una formulación puede incluir una población de células T que expresan AT-CAR, o más de una, tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más poblaciones de células T que expresan AT-CAR. Las diferentes poblaciones de células T AT-CAR pueden variar de acuerdo con la identidad del dominio de unión a la etiqueta, la identidad del dominio de activación, la identidad de la subpoblación de células T o una combinación de las mismas. Por ejemplo, una formulación puede comprender poblaciones de células T que expresan AT-CAR que reconocen y se unen a una, o más de una, tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más proteínas etiquetadas diferentes. Como ejemplo, una formulación puede comprender poblaciones de células T que expresan AT-CAR que reconocen y se unen a FITC, biotina y PE. Por lo tanto, en este ejemplo, la formulación comprende tres poblaciones diferentes de células T que expresan AT-CAR que reconocen y se unen a las células etiquetadas por anticuerpos conjugados con FITC, anticuerpos conjugados con biotina y anticuerpos conjugados con PE. Por lo tanto, esta formulación comprendería células T que expresan α FITC-CAR, células T que expresan α biotina-CAR y células T que expresan α PE-CAR.

Las formulaciones que comprenden una población o poblaciones de células T AT-CAR deben administrarse a un sujeto usando modos y técnicas conocidas por el experto en la materia. Los ejemplos de estos modos incluyen, pero no se limitan a, inyección intravenosa. Otros modos incluyen, sin limitación, inyección intratumoral, intradérmica, subcutáneo (sc, sq, sub-Q, Hypo), intramuscular (im), intraperitoneal (ip), intraarterial, intramedular, intracardiaca, intraarticular (articulación), intrasinovial (área de líquido articular), intracraneal, intraespinal e intratecal (líquido cefalorraquídeo). Cualquier dispositivo conocido útil para inyección parenteral o infusión de las formulaciones se puede usar para efectuar dicha administración.

Las formulaciones que comprenden una población o poblaciones de células T que expresan AT-CAR que se van a administrar a un sujeto comprenden un número de células T que expresan AT-CAR que es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de la indicación o enfermedad específica. Por lo tanto, las poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR se administrarán a los sujetos cuando se practiquen los usos de la presente invención. En general, las formulaciones que se administrarán comprenden entre aproximadamente 1×10^4 y aproximadamente 1×10^{10} células T que expresan AT-CAR. En la mayoría de los casos, la formulación comprenderá entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^9 células T que expresan AT-CAR, desde aproximadamente 5×10^5 hasta aproximadamente 5×10^8 células T que expresan AT-CAR, o de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^7 células T que expresan AT-CAR. Sin embargo, el número de células T que expresan AT-CAR que se administrarán a un sujeto variará entre amplios límites, dependiendo de la ubicación, fuente, identidad, extensión y gravedad del cáncer, la edad y el estado del individuo a tratar, etc. Un médico determinará en última instancia las dosis apropiadas que se utilizarán.

Proteínas etiquetadas. Las proteínas etiquetadas deben administrarse a un sujeto antes de, o simultáneamente con, o después de la administración de las células T que expresan AT-CAR. Las proteínas etiquetadas se unen a las células objetivo en el sujeto. En general, la porción de "proteína" de la proteína etiquetada es la porción de la molécula que se une a la célula objetivo. La proteína es un anticuerpo que se une a un antígeno asociado a tumor (TAA) o un antígeno específico de tumor (TSA) expresado por la célula objetivo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de proteínas incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales anticancerígenos tales como cetuximab (anti-EGFR), nimotuzumab (anti-EGFR), panitumumab (anti-EGFR), rituximab (anti-CD20), omalizumab (anti-CD20), tositumomab (anti-CD20), trastuzumab (anti-Her2), gemtuzumab (anti-CD33), alemtuzumab (anti-CD52) y bevacuzimab (anti-VEGF).

La porción de "etiqueta" de la proteína etiquetada solo está limitada por ser una molécula que puede ser reconocida y específicamente unida por el AT-CAR, específicamente, el dominio de unión a la etiqueta del AT-CAR. Los ejemplos de etiquetas incluyen, pero no se limitan a, isotiocianato de fluoresceína (FITC), dinitrofenol, complejo de proteína peridina clorofila, proteína verde fluorescente, biotina, ficoeritrina (PE), histidina, estreptavidina, peroxidasa de rábano picante, palmitoilación, nitrosilación, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa, glutatión S-transferasa, proteína de unión a maltosa y cualquier tipo de materiales fluorescentes, incluidos los nanocristales de puntos cuánticos.

Por lo tanto, en algunos aspectos, las proteínas etiquetadas incluyen anticuerpos conjugados con FITC, anticuerpos conjugados con biotina, anticuerpos conjugados con PE, anticuerpos conjugados con histidina y anticuerpos conjugados con estreptavidina, en los que el anticuerpo se une a un TAA o un TSA expresado por las células objetivo. Por ejemplo, las proteínas etiquetadas utilizadas en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, cetuximab conjugado con FITC, rituximab conjugado con FITC, herceptina conjugada con FITC, cetuximab conjugado con biotina, rituximab conjugado con biotina, herceptina conjugada con biotina, cetuximab conjugado con PE, rituximab conjugado con PE, herceptina conjugada con PE, cetuximab conjugado con histidina, rituximab conjugado con histidina, herceptina conjugada con histidina, cetuximab conjugado con estreptavidina, rituximab conjugado con estreptavidina y herceptina conjugada con estreptavidina. Alternativamente, las células AT-CAR pueden ser redirigidas para atacar y/o destruir células vasculares que alimentan el tumor. Por ejemplo, las células T que expresan α FITC-VEGF como el AT-CAR pueden atacar a las células vasculares endoteliales a las que se une VEGF etiquetado con FITC, en las que el VEGF etiquetado con FITC está unido por el receptor del VEGF.

En algunos aspectos, una proteína que carece de una etiqueta puede usarse como la proteína etiquetada. Por ejemplo, una proteína desnuda (sin etiqueta) (un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) que se une a un TAA o un TSA en una célula objetivo puede usarse como la proteína etiquetada. En tales circunstancias, el AT-CAR reconocerá y se unirá específicamente a la proteína. Como ejemplo, el dominio de unión a la etiqueta puede ser un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que reconoce y se une a un segundo anticuerpo, en el que el segundo anticuerpo funciona como la proteína etiquetada y en el que el segundo anticuerpo carece de una etiqueta.

La etiqueta puede conjugarse con las proteínas usando técnicas tales como acoplamiento químico y entrelazadores químicos. Alternativamente, se pueden preparar vectores polinucleotídicos que codifican las proteínas etiquetadas como proteínas de fusión. Las líneas celulares pueden modificarse para expresar las proteínas etiquetadas, y las proteínas etiquetadas pueden aislarse de los medios de cultivo, purificarse y usarse en los usos descritos en este documento.

Las proteínas etiquetadas pueden formularse para la administración a un sujeto usando técnicas conocidas por el experto en la materia. Las formulaciones de las proteínas etiquetadas pueden incluir un excipiente o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes incluidos en las formulaciones tendrán diferentes propósitos dependiendo, por ejemplo, de la naturaleza de la etiqueta, la proteína y el modo de administración. Los ejemplos de excipientes generalmente utilizados incluyen, sin limitación: solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua para inyección, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos, agentes estabilizantes, agentes solubilizantes y tensioactivos, tampones y conservantes, agentes de tonicidad, agentes de carga y agentes lubricantes.

Una formulación de proteínas etiquetadas puede incluir un tipo de proteína etiquetada, o más de uno, tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más tipos de proteínas etiquetadas. Los diferentes tipos de proteínas etiquetadas pueden variar de acuerdo con la identidad de la etiqueta, la identidad de la proteína o ambas. Por ejemplo, una formulación que comprende tres tipos de proteínas etiquetadas podría incluir cetuximab conjugado con FITC, rituximab conjugado con FITC y herceptina conjugada con FITC o cetuximab conjugado con FITC, cetuximab conjugado con biotina y cetuximab conjugado con PE.

Las proteínas etiquetadas deben administrarse a un sujeto usando modos y técnicas conocidas por el experto en la materia. Los ejemplos de modos incluyen, pero no se limitan a, inyección intravenosa, intraperitoneal e intratumoral. Otros modos incluyen, sin limitación, inyección intradérmica, subcutánea (sc, sq, sub-Q, Hypo), intramuscular (im), intraarterial, intramedular, intracardiaca, intraarticular (articulación), intrasinovial (área de líquido articular), intracraneal, intraespinal e intratecal (fluidos espinales). Cualquier dispositivo conocido útil para inyección parenteral o infusión de las formulaciones se puede usar para efectuar dicha administración.

Las formulaciones que comprenden las proteínas etiquetadas deben administrarse a un sujeto en una cantidad que sea eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de la indicación o enfermedad específica. En general, las formulaciones que comprenden al menos aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal de las proteínas etiquetadas deben administrarse a un sujeto que necesite del tratamiento. En la mayoría de los casos, la dosis es de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal de las proteínas etiquetadas diariamente, teniendo en cuenta las vías de administración, síntomas, etc. Como ejemplo, se debe administrar bevacizumab etiquetado en una dosis de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 5 mg/kg. Como otro ejemplo, el cetuximab etiquetado debe administrarse en una dosis que varía de aproximadamente 100 a aproximadamente 400 mg/m². Sin embargo, la cantidad de proteína etiquetada en las formulaciones que debe administrarse a un sujeto variará entre amplios límites, dependiendo de la ubicación, la fuente, la identidad, el alcance y la gravedad del cáncer, la edad y el estado del individuo a ser tratado, etc. Un médico determinará en última instancia las dosis apropiadas que se utilizarán.

Cáncer. La presente invención se refiere a una o más formulaciones de proteínas etiquetadas y una o más poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan el receptor de antígeno quimérico antietiqueta (AT-CAR), en las que la proteína es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un antígeno asociado a tumor (TAA) y las proteínas de cada formulación de proteínas etiquetadas son iguales o diferentes y los AT-CAR de cada población de células T que expresan AT-CAR son iguales o diferentes y el AT-CAR comprende un dominio de

unión a etiqueta, un dominio transmembrana y un dominio de activación de células T, en el que las células T que expresan AT-CAR se unen a la etiqueta de las proteínas etiquetadas e inducen la muerte de células cancerosas, para usar en una terapia de combinación para tratar el cáncer en un sujeto en el que dichas una o más formulaciones de proteínas etiquetadas y dichas una o más poblaciones de células T que expresan (AT-CAR) se administran ambas al sujeto, tratando así el cáncer en el sujeto. El término "cáncer" está destinado a ser interpretado ampliamente y abarca todos los aspectos del crecimiento celular anormal y/o división celular. Los ejemplos incluyen: carcinoma, que incluye, entre otros, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma adenoescamoso, carcinoma anaplásico, carcinoma de células grandes, carcinoma de células pequeñas y cáncer de piel, mama, próstata, vejiga, vagina, cuello uterino, útero, hígado, riñón, páncreas, bazo, pulmón, tráquea, bronquios, colon, intestino delgado, estómago, esófago, vesícula biliar; sarcoma, que incluye, entre otros, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, hemangioendoteliooma maligno, schwannoma maligno, osteosarcoma, sarcoma de tejidos blandos y cánceres de tejido óseo, cartílago, grasa, músculo, vascular y hematopoyético; linfoma y leucemia, que incluyen, entre otros, neoplasias de células B maduras, tales como leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño, leucemia prolinfocítica de células B, linfomas y neoplasias de células plasmáticas, células T maduras y neoplasias de células asesinas naturales (NK), tales como leucemia prolinfocítica de células T, leucemia linfocítica granular grande de células T, leucemia agresiva de células NK y leucemia/linfoma de células T adultas, linfomas de Hodgkin y trastornos linfoproliferativos asociados a la inmunodeficiencia; tumores de células germinales, que incluyen, entre otros, cáncer testicular y de ovario; blastoma, incluidos, entre otros, hepatoblastoma, meduloblastoma, nefroblastoma, neuroblastoma, pancreatoblastoma, blastoma pleuropulmonar y retinoblastoma. El término también abarca tumores benignos.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento" tienen sus significados ordinarios y habituales, e incluyen uno o más de: bloqueo, mejora o disminución de la gravedad y/o frecuencia de un síntoma de cáncer en un sujeto, y/o inhibición del crecimiento, división, diseminación o proliferación de células cancerosas, o progresión del cáncer (por ejemplo, aparición de nuevos tumores) en un sujeto. El tratamiento significa bloquear, mejorar, disminuir o inhibir en aproximadamente 1% a aproximadamente 100% frente a un sujeto en el que no se han practicado los usos de la presente invención. Preferiblemente, el bloqueo, mejora, disminución o inhibición es de aproximadamente 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o 1% frente a un sujeto en el que no se han practicado los usos de la presente invención.

Las frecuencias de administración de ambas formulaciones que comprenden poblaciones de células T que expresan AT-CAR y formulaciones de proteínas etiquetadas variarán dependiendo de factores que incluyen la enfermedad que se está tratando, los elementos que comprenden las células T que expresan AT-CAR y las proteínas etiquetadas, y los modos de administración. Cada formulación puede administrarse independientemente 4, 3, 2 o una vez al día, cada dos días, cada tercer día, cada cuarto día, cada quinto día, cada sexto día, una vez a la semana, cada ocho días, cada nueve días, cada diez días, quincenal, mensual y cada dos meses.

La duración del tratamiento se basará en la enfermedad a tratar y la determinará mejor el médico tratante. Sin embargo, se prevé que la continuación del tratamiento dure varios días, semanas o meses.

La presente invención ofrece flexibilidad en los usos de las proteínas etiquetadas y las células T que expresan AT-CAR para el tratamiento, y como resultado, la formulación o formulaciones de proteínas etiquetadas y la población o poblaciones de células T que expresan AT-CAR se administrarán al sujeto en cualquier orden. Por lo tanto, la formulación o formulaciones de proteínas etiquetadas se administrarán a un sujeto antes, después o simultáneamente con la población o poblaciones de células T que expresan AT-CAR. Alternativamente, cuando se va a administrar a un sujeto más de una formulación de proteínas etiquetadas y/o más de una población de células T que expresan AT-CAR, la administración puede ser escalonada. Por ejemplo, se administrará una primera formulación de proteínas etiquetadas, seguida de una primera población de células T que expresan AT-CAR, que luego será seguida por una segunda formulación de proteínas etiquetadas y luego una segunda población de células T que expresan AT-CAR.

La presente invención también incluye usos mediante los cuales una población de células T que expresan AT-CAR se recubre con proteínas etiquetadas antes de la administración de las células T que expresan AT-CAR al sujeto.

En cada una de las realizaciones de la presente invención, el sujeto que recibe tratamiento es un animal humano o no humano, por ejemplo, un primate no humano, ave, caballo, vaca, cabra, oveja, un animal de compañía, tal como un perro, gato o roedor u otro mamífero.

La presente descripción también proporciona un kit que comprende uno o más contenedores llenos con una o más poblaciones de células T que expresan AT-CAR y una o más formulaciones de proteínas etiquetadas. El kit también puede incluir instrucciones de uso. Además, el kit puede incluir una notificación en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, notificación que refleja la aprobación de la agencia de fabricación, uso o venta para la administración humana.

IV. Ejemplos

Ratones y líneas celulares. Los ratones NOD-scid IL2Rgamma^{nu10} (NSG) fueron adquiridos a través del Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EE. UU.), alojados en la instalación de animales libres de patógenos específicos de la Universidad de Maryland, Baltimore, y utilizados como receptores de inmunoterapia adoptiva. Los experimentos fueron

revisados y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Maryland en Baltimore. La línea celular SW480 de adenocarcinoma de colon humano EGFR+ (ATCC, Manassas, VA) se mantuvo en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (marca GIBCO; Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) suplementado con suero fetal bovino al 10% inactivado con calor (Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA, EE. UU., L-glutamina 2 mM (marca GIBCO; Invitrogen) y penicilina-estreptomina al 1% (marca GIBCO; Invitrogen). La línea celular Panc 6.03 de adenocarcinoma pancreático EGFR+ HER2+ fue amablemente proporcionada por la Dra. Elizabeth Jaffee (Sidney Kimmel Cancer Center en Johns Hopkins), y se cultivó en medio RPMI 1640 (marca GIBCO; Invitrogen) suplementado con FBS al 20%, aminoácidos no esenciales en MEM al 1% (marca GIBCO; Invitrogen), piruvato de sodio al 1% (marca GIBCO; Invitrogen), L-glutamina 2 mM, penicilina-estreptomina al 1% y 100 UI/mL de insulina. La línea celular AU565 de adenocarcinoma de mama HER-2+ (ATCC) se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 10%, L-glutamina 2 mM y penicilina-estreptomina al 1%. La línea celular de empaque Phoenix Ampho se adquirió a través de Orbigen (San Diego, CA, EE. UU.) y se mantuvo en medio D10 que contenía DMEM, FBS al 10%, piruvato de sodio al 1%, L-glutamina 2 mM y penicilina-estreptomina al 1%. La expresión superficial de EGFR o HER2 en las líneas celulares SW480, Panc 6.03 y AU565 se determinó por citometría de flujo usando Cetuximab conjugado con FITC (Ctx) o Herceptina conjugada con FITC (Her2).

Construcción del vector retroviral. El esqueleto del vector retroviral pMSGV1-CD8-28BBZ (Hughes MS et al., Transfer of a TCR gene derived from a patient with a marked antitumor response conveys highly active T-cell effector functions. Hum Gene Ther; abril de 2005; 16 (4): 457-72) fue un regalo amable del Dr. Richard Morgan (Instituto Nacional del Cáncer) y se deriva del pMSGV (vector de empalme basado en el virus de células madre murinas). La Figura 1A muestra la representación esquemática del constructo del vector y el orden de colocación de los componentes en el marco desde los extremos 5' a 3'. El scFv de ratón contra FITC se refiere a α FITC-CAR y está unido a las regiones de bisagra y transmembrana de la cadena CD8 α humana (secuencia de nucleótidos 1271-1519, GenBank NM 001768.6), y las regiones citoplasmáticas de las moléculas CD28 humana (secuencia de nucleótidos 760- 882, GenBank NM 006139.2), 4-1BB (secuencia de nucleótidos 886-1026, GenBank NM 001561.5) y CD3 ζ (secuencia de nucleótidos 299-637, GenBank NM 000734.3). La secuencia α FITC-CAR fue sintetizada por BlueHeron (Bothell, WA).

La secuencia se confirmó mediante secuenciación de ADN y tiene la siguiente secuencia:
 agttgcctgttaggtgtgtgctgctgattcctgctccagcagtgatgctgctgtagtgcacccaaactccactctccctgctgctgctgct
 30 tggagatcaagcctccatctctgcatagctagcagagcctgtacacagtaatggaaacacctaattacgttggtacctgcagaagccagg
 ccagtctcaaagctcgtgactacaagttccaacggatttctggggtccagacaggttcagtgccagtgatgagggacagattcac
 actcaagatcagcagagtgaggctgaggatctgggagttattctgctctcaaagtacacatgttccgtggcagctgggtagggcacca
 agctggaaatcaaaagtagtgctgctgctgctgaagaaggatgctgctgaagaaggatgctgctgaagaaggatgctgctgaagaaggatgctg
 35 ggtgaagctggatgagactggaggaggctggtgcaacctggaggccatgaaactctcctggttgctgctgattcacttttagtgacta
 ctggatgaactgggtccgagctccagagaagggactggagtggtgacacaaatagaacaacactataattatgaacatattattc
 agattctgtgaaaggcagattcaccatctcaagagatgattccaaagtagtgctcctgcaaatgaacaacttaagagtgtagacatggg
 tatctattactgtacgggttctactatggtatggactactgggtcaaggacctcagtcaccgtctcc (SEQ ID NO:1). La secuencia se ligó en pMSGV1 para generar el vector retroviral α FITC-CAR.

Transducción retroviral de células T humanas. Las células mononucleares de sangre periférica HLA-A2+ (PBMC) de donantes sanos se adquirieron a través de Biological Specialty Corp (Colmar, PA, EE. UU.) y se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.). Se cultivaron PBMC aisladas a 3×10^6 por pozo en placas de cultivo de tejidos de 24 pozos en medio AIM V (marca GIBCO; Invitrogen) suplementado con suero AB humano al 5% (Sigma-Aldrich), aminoácidos no esenciales en MEM al 1%, penicilina-estreptomina al 1% y 100 U/mL de IL-2 humana recombinante (BioLegend, San Diego, CA, EE. UU.), y activadas con 50 ng/mL de OKT3 (eBioscience, San Diego, CA, EE. UU.). Dos días después, se recolectaron células para la transducción retroviral. Para la transducción, se recubrieron las placas de 24 pozos tratadas con cultivo sin tejido (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) con 0,5 mL por pozo de fragmento de fibronectina humana recombinante de 10 μ g/mL (RetroNectin; Takara, Otsu, Shiga, Japón) toda la noche a 4 °C. Después de la incubación, los pozos se bloquearon con 1 mL de solución salina equilibrada de Hanks (marca GIBCO; Invitrogen) más suero AB humano al 2,5% durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se lavaron con solución salina equilibrada de Hanks más ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) al 2,5% (marca GIBCO; Invitrogen). Las transducciones se realizaron como se describió previamente (Johnson et al., Blood 114, 535-546 (2009)). En resumen, se añadieron aproximadamente 2,5 mL de sobrenadante retroviral a cada pozo recubierto seguido por centrifugación a 2000 g durante 2 ha 32 °C. Se removieron 1,5 mL de sobrenadante viral y se añadieron 1×10^6 (0,5 mL) de PBMC activadas a cada pozo en presencia de 100 U/mL de IL-2. Las placas se centrifugaron a 1000 g durante 10 minutos, y luego se incubaron durante la noche a 37 °C. Después de la transducción, las células se lavaron y se mantuvieron en presencia de IL-2 (100 U/mL) y se usaron en experimentos cinco días después de la transducción. La expresión superficial de α FITC-CAR en células T humanas transducidas se determinó mediante citometría de flujo después de teñir las células con CD3 o CD8 y cetuximab conjugado con FITC. En algunos experimentos, las células T transducidas con α FITC-CAR se tiñeron con perlas de dextrano conjugadas con FITC. Las células teñidas con IgG humana purificada conjugada con FITC (Invitrogen) se usaron como control de isotipo.

Ensayo de proliferación de células T, ensayo de producción de citocinas y quimiocinas. Tres a cinco días después de la transducción, se cultivaron 1×10^5 células T en placas de fondo redondo de 96 pozos recubiertas con cetuximab,

5 cetuximab conjugado con FITC o FITC-Dextrano durante 72 horas. Para la reactividad específica de las células T
 10 contra las células tumorales, se pulsaron células SW480 con las concentraciones indicadas de anticuerpos durante 1
 hora a 37 °C, se lavaron 3 veces. Se cultivaron conjuntamente 1×10^5 células T efectoras y 1×10^5 células tumorales
 en 200 μ L de volumen de cultivo en placas de fondo redondo de 96 pozos durante 72 horas. Dieciséis horas antes de
 la cosecha, se añadieron 0,5 μ Ci de 3 H-timidina a cada pozo antes de medir la absorción de timidina utilizando un
 contador 1450 LSC y de luminiscencia (PerkinElmer, Waltham, MA, EE. UU.). Los niveles de producción de citoquinas
 y quimiocinas se midieron a partir de sobrenadantes de cultivo recogidos 48 horas después de la estimulación usando
 un kit de citocinas/quimiocinas (Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En
 algunos experimentos, los explantes tumorales se picaron finamente y se cultivaron en tripsina durante 2 horas a 37
 °C seguido de enriquecimiento de células T usando un kit de selección negativa (Invitrogen/Life Technologies, Grand
 Island, NY). Se cultivaron conjuntamente 200.000 células T con células de cáncer de colon SW480 (50.000) que
 habían sido pulsadas con FITC-Ctx o Ctx (0,5 μ g/ 1×10^6 células). Tres días después, se determinó la proliferación
 mediante la absorción de [3 H]timidina (\pm DE) o se midió la producción de citocinas y quimiocinas usando una matriz
 Milliplex.

15 Ensayo de citotoxicidad. La actividad citotóxica contra las células objetivo tumorales se midió usando un ensayo
 estándar de liberación de 51 Cr. Se marcaron 1×10^6 células objetivo con 200 μ Ci de 51 Cr durante 2 horas a 37 °C, se
 lavaron 3 veces y se pulsaron con anticuerpos antihumanos durante 1 ha 37 °C. Luego, se cultivaron conjuntamente
 20 1×10^4 células objetivo marcadas con cantidades decrecientes de células T efectoras en las relaciones efector a
 objetivo (E:T) indicadas en 200 μ L de volumen de cultivo en placas de fondo redondo de 96 pozos. Las células objetivo
 incubadas en medio solamente se usaron para determinar la liberación espontánea de 51 Cr, y la liberación máxima se
 determinó incubando células objetivo marcadas en Triton X-100 al 10%. Después de 5 horas a 37 °C, se recogieron
 50 μ L de sobrenadante y se midió la radiactividad de 51 Cr en un contador 1450 LSC y de luminiscencia. El porcentaje
 25 medio de lisis específica se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación: % de lisis específica = (liberación de prueba
 - liberación espontánea)/(liberación máxima - liberación espontánea) \times 100. Todas las pruebas se realizaron en pozos
 por triplicado y los resultados se muestran como la media \pm DE.

30 Modelos tumorales e inmunoterapia adoptiva. En modelos de tumor profiláctico, se inyectaron ratones NSG machos
 de 6 a 8 semanas de edad (n = 5 para cada grupo) por vía subcutánea (sc) en el flanco de la pata trasera con $1 - 2 \times$
 10^6 células tumorales SW480 o Panc 6.03. Un día después, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente (ip)
 con FITC-Ctx o Ctx (25 μ g/ratón). Un día después de la inyección de Ctx, se inyectó a los ratones por vía intravenosa
 (iv) 5×10^6 células T humanas transducidas con α FITC-CAR. Después de la transferencia de las células T adoptivas,
 los ratones fueron inyectados ip con anticuerpos (25 μ g/ratón) semanalmente durante tres semanas. El área del tumor
 se midió con calibradores digitales de manera ciega dos o tres veces por semana, y se calcularon los tamaños de los
 35 tumores (mm^2) por medición perpendicular por diámetro longitudinal. Los ratones se sacrificaron cuando los tamaños
 de lo tumores alcanzaban 200 mm^2 o si los ratones se volvieron moribundos o tenían problemas para deambular.
 Todos los experimentos se realizaron independientemente al menos dos veces con resultados similares. Los datos de
 supervivencia se analizaron con la prueba exacta de Log-rank.

40 Experimento 1. Las células mononucleares de sangre periférica se activaron con mAb anti-CD3 en presencia de IL-2
 seguido de transducción con el vector α -FITC-CD28-41BB-CD3 ζ -CAR (denominado α FITC-CAR) como se muestra
 en la Figura 1A y como se describió anteriormente. La expresión del scFv α FITC en células T se analizó mediante
 tinción de células con perlas anti-CD8 (o anti-CD3) y cetuximab marcado con FITC (FITC-Ctx) o dextrano marcado
 con FITC (FITC-Dex). En promedio, el 60% de las células T totales expresaron α FITC-CAR (Figura 1B). Para confirmar
 45 su funcionalidad y especificidad, se activaron las células T α FITC-CAR o control (transducidas en forma simulada)
 usando concentraciones de titulación de FITC-Ctx unido a la placa, cetuximab no unido o perlas de FITC-Dex. Las
 células T α FITC-CAR proliferaron vigorosamente y de forma dependiente de la dosis después de la estimulación con
 FITC-Ctx y FITC-Dex, pero no se dividieron en respuesta a la estimulación con Ctx solo (Figura 1C, panel izquierdo).
 Por el contrario, las células T de control no proliferaron con FITC-Ctx o FITC-Dex (Figura 1C, panel derecho). Las
 50 células T también se cultivaron conjuntamente con células de cáncer de colon EGFR⁺ (SW480) que se habían teñido
 con concentraciones de titulación de FITC-Ctx. La reactividad de FITC por las células T α FITC-CAR se demostró por
 su capacidad para dividirse después de la activación con células cancerosas teñidas con FITC-Ctx, Figura 1D. Sin
 embargo, la proliferación fue similar a la del control a las concentraciones más bajas de FITC-Ctx. Las células T de
 control no proliferaron en respuesta a cualquier concentración de células cancerosas teñidas con FITC-Ctx, Figura 1D.

55 Para determinar su capacidad citolítica, se cultivaron células T α FITC-CAR junto con células de cáncer de colon
 SW480 teñidas con FITC-Ctx en diversas relaciones de efector a objetivo. Las células T α FITC-CAR lisaron las células
 de cáncer de colon SW480 en relaciones de efector a objetivo tan bajas como una célula T a veinte células objetivo
 (Figura 1E, panel izquierdo) pero no lisaron las células cancerosas marcadas con IgG de ratón-FITC (Figura 1E, panel
 60 derecho) De manera similar, las células T de control no mostraron un nivel apreciable de actividad citolítica contra las
 células cancerosas SW480 marcadas con FITC-Ctx o marcadas con FITC-IgG (Figura 1E). Para confirmar su
 capacidad de reconocer una variedad de células objetivo que expresan diferentes antígenos, las células T α FITC-CAR
 se cultivaron conjuntamente con células de cáncer de páncreas (Panc 6.03) teñidas con FITC-Ctx o teñidas con FITC-
 Herceptina (mAb anti-Her-2; FITC-Her2) y células de cáncer de mama (AU565) teñidas con FITC-Her2. Las células T
 65 α FITC-CAR lisaron eficazmente y específicamente las células cancerosas teñidas con FITC-Ctx o FITC-Her2 (Figura

1F). Vale la pena señalar que el aumento de la actividad citolítica contra las células de cáncer de páncreas teñidas con FITC-Her2 por encima de las células teñidas con FITC-Ctx probablemente esté asociado con el nivel de expresión más alto de Her-2 en comparación con EGFR (datos no mostrados). Además, las células T α FITC-CAR produjeron una amplia gama de citocinas beneficiosas para la supervivencia, expansión y quimiotaxis de las células T (Tabla 1). Los niveles de citocinas de fondo producidos por las células T de control activadas con células cancerosas teñidas con FITC-Ctx o Ctx eran idénticas entre sí.

	Ctx	+FITC-Ctx	Veces que cambia
FGF-2	1,9 \pm (0,79)	15,8 \pm (2,59)	8,1
GM-CSF	45,7 \pm (5,26)	2803,3 \pm (57,74)	61,2
IL-2	13,4 \pm (2,6)	193 \pm (8,5)	14,4
IL-3	1,1 \pm (0,22)	31,4 \pm (6,50)	26,5
IL-5	1,7 \pm (0,01)	6,3 \pm (0,07)	3,6
IL-7	0,7 \pm (0,64)	2,2 \pm (0,32)	3,0
IL-9	0,6 \pm (1,06)	1,8 \pm (0,25)	2,9
IL-12 p70	0,3 \pm (0,59)	1,0 \pm (0,10)	3,1
IL-13	0,3 \pm (0,62)	311,6 \pm (6,51)	873,8
IL-17	16,6 \pm (2,15)	644,6 \pm (20,84)	38,6
sIL-2Ra	61,4 \pm (5,18)	919,6 \pm (59,03)	14,9
sCD40L	27,6 \pm (5,92)	1406,6 \pm (158,22)	50,90
IFN- γ	4,3 \pm (0,98)	2906,6 \pm (162,58)	662,1
TNF- α	4,5 \pm (0,41)	395,6 \pm (33,26)	87,8
TNF- β	1,3 \pm (0,10)	81,1 \pm (7,71)	61,4
MCP-1 (CCL2)	5,1 \pm (0,53)	2243,3 \pm (284,31)	437,8
MIP-1 α (CCL3)	6,7 \pm (0,89)	3234,3 \pm (225,02)	483,8
MIP-1 β (CCL4)	7,8 \pm (1,39)	986,3 \pm (40,99)	125,3
RANTES (CCL5)	0	778,3 \pm (66,37)	778
MCP-3 (CCL7)	2,0 \pm (1,77)	194,3 \pm (4,73)	94,9
MDC (CCL22)	136,3 \pm (13,65)	6503,3 \pm (551,75)	47,7
Eotaxina (CCL11)	3,2 \pm (1,29)	32,1 \pm (3,56)	9,8
IP-10 (CXCL10)	14,9 \pm (1,60)	14166,6 \pm (1484,3)	950,7

Tabla 1: Producción de citocinas y quimiocinas por células T α FITC-CAR. Las PBMC HLA-A2⁺ fueron activadas con anticuerpos anti-CD3 en presencia de IL-2 seguido por transducción con retrovirus α FITC-CAR. La funcionalidad de α FITC-CAR sobre los transducidos fue determinada por su habilidad para producir citocinas y quimiocinas seguido por la activación de células de cáncer de colon SW480 que fueron teñidas con FITC-Ctx o Ctx. Los niveles de varias citocinas y quimiocinas producidas por células T α FITC-CAR fueron medidas 72 horas después de la estimulación usando una citocinas/quimiocinas Milliplex. Estos datos son representativos de tres experimentos independientes (tres diferentes donantes) con cada experimento produciendo las mismas tendencias.

En conjunto, estos datos demuestran: 1) la funcionalidad de las células T α FITC-CAR, 2) su especificidad frente a las células teñidas con FITC-Ab pero no las FITC solubles, 3) su capacidad para lisar un conjunto diverso de tipos de células tumorales, y 4) el uso de varios anticuerpos marcados con FITC.

Experimento 2. Se examinó la capacidad para redirigir las células T α FITC-CAR para eliminar las células tumorales *in vivo*. Los ratones fueron inyectados sc con células de cáncer de colon SW840 seguido por la administración de FITC-Ctx o Ctx a través de inyección ip. Un día después, se administraron células T α FITC-CAR a través de inyección iv en la vena de la cola. La cinética del crecimiento tumoral fue similar entre los ratones que recibieron células T α FITC-CAR más Ctx y aquellas que recibieron Ctx solo, Figura 2A, panel izquierdo. En marcado contraste, el crecimiento tumoral se suprimió en gran medida en ratones que recibieron células T α FITC-CAR más FITC-Ctx (Figura 2A, panel izquierdo). Del mismo modo, la aparición libre de tumor (Figura 2A panel central) y la supervivencia general (Figura 2A panel derecho) mejoró significativamente en ratones que recibieron células T α FITC-CAR más FITC-Ctx en comparación con los grupos de control. Sin embargo, a pesar de esta ventaja de supervivencia, los ratones que recibieron células T α -FITC-CAR más FITC-Ctx sucumbieron al desafío tumoral dentro de los 55 días posteriores a la implantación del tumor.

Los mecanismos que contribuyen al fallo de las células T α FITC-CAR en el tratamiento a largo plazo se investigaron adicionalmente. Debido a que las células T se activaron con mAb CD3 e IL-2, las células T CAR pueden mostrar una vida más corta a pesar de recibir señales de supervivencia de CD28 o 41BB (Sadelain et al., Curr. Opin. Immunol. 21, 215-223 (2009); Brentjens et al., Nat. Med. 9, 279-286 (2003)). Se analizó la presencia de células T α FITC-CAR en diversos tejidos, incluidos el bazo, el hígado, la médula ósea, la circulación y en los explantes tumorales. Se

encontraron células T α FITC-CAR en todos los tejidos analizados. Aproximadamente el 10% de todas las células T humanas detectadas en los explantes tumorales eran células T α FITC-CAR, Figura 2B. Se encontraron porcentajes similares en los otros tejidos (datos no mostrados). Sin embargo, el porcentaje general de células T α FITC-CAR en el momento de la recolección de órganos (entre los días 38 y 45) fue significativamente menor que el porcentaje inicial del 60% en la infusión. También vale la pena señalar que del 60% al 90% de las células T recuperadas de los ratones eran CD8⁺, en comparación con el porcentaje inicial del 40-50%. Estos datos sugieren una ventaja potencial de supervivencia del subconjunto CD8⁺ sobre las células T CD4⁺ *in vivo*. La frecuencia o el papel de T_{Regs} CD4 no se examinó, pero sigue siendo una opción viable que merece una mayor investigación.

Como alternativa, las células T α FITC-CAR podrían no haberse activado suficientemente por el antígeno (FITC) tal vez debido a la anergia u otros mecanismos supresores. Las células T totales se enriquecieron con el explante tumoral y se reactivaron inmediatamente usando células SW480 del cultivo de tejidos que se tiñeron con FITC-Ctx o Ctx solo. Las células T α FITC-CAR proliferaron (Figura 2C) y produjeron varias moléculas efectoras y quimiocinas (Figura 2D) después de la estimulación con células SW480 teñidas con FITC-Ctx pero no respondieron a células SW480 teñidas con Ctx. Desafortunadamente, el número de células T α FITC-CAR aisladas de explantes tumorales no fue suficiente para evaluar su aptitud para matar. Sin embargo, de acuerdo con su capacidad para dividir y producir moléculas efectoras *ex vivo*, las células T α -FITC-CAR son claramente capaces de responder a la estimulación con FITC.

Con base en las observaciones de que α -FITC-CAR estaban presente en ratones y respondía a la estimulación con FITC-CAR, se examinó la expresión de EGFR en explantes tumorales. De acuerdo con lo examinado por citometría de flujo, todos los explantes de tumores estaban completamente desprovistos de expresión de EGFR en comparación con el control de isotipo y con células SW480 tomadas de cultivo de tejidos (Figura 2E). Además, aunque la mayoría de las células SW480 tomadas del cultivo de tejidos expresaban EGFR, su expresión era heterogénea con algunas células que carecían de EGFR.

En conjunto, estos datos respaldan la afirmación de que α FITC-CAR mató las células EGFR⁺ pero con el tiempo permitió el crecimiento de células EGFR que ya no eran un objetivo para las células T α FITC-CAR. La falta de expresión de EGFR, y por lo tanto la falta de estimulación mediada por FITC, también podría haber contribuido a la menor frecuencia de células T α FITC-CAR observadas en puntos de tiempo posteriores en ratones portadores de tumores en comparación con el porcentaje de células T α FITC-CAR antes de la inyección. Además, estos datos resaltan el potencial de escape del tumor en pacientes en los que TAA se expresa de manera heterogénea. Estos estudios también enfatizan la necesidad potencial de usar células T CAR con especificidad para varios TAA. Una ventaja del uso de una célula T CAR antietiqueta es el potencial de usar varios anticuerpos reactivos al tumor 'etiquetados' con FITC simultáneamente. Alternativamente, el uso de CAR que expresan scFv específicos para biotina o anticuerpos conjugados con PE se sumaría a la diversidad de CAR antietiqueta.

Experimento 3. Dada la heterogeneidad de la expresión de EGFR en células cancerosas SW480, se examinó la capacidad de las células T α FITC-CAR para destruir una población de células cancerosas en la que todas las células expresaban el antígeno. La línea celular de cáncer de páncreas Panc 6.03 se seleccionó ya que las células expresan uniformemente EGFR (Figura 3A). La actividad citolítica de las células T α FITC-CAR se examinó en un modelo de tumor profílactico utilizando el mismo procedimiento descrito en el Experimento 2. El crecimiento tumoral se suprimió claramente en ratones que recibieron células T α FITC-CAR más FITC-Ctx, mientras que los ratones que recibieron células T α -FITC-CAR más Ctx demostraron un rápido crecimiento tumoral, Figura 3B, panel izquierdo. Todos los ratones que recibieron células T α FITC-CAR más Ctx sucumbieron al desafío tumoral dentro de los 35 días posteriores a la implantación del tumor, Figura 3B, panel derecho. Vale la pena señalar que la administración de FITC-Ctx a través de inyección iv, ip o intratumoral resultó en la localización de anticuerpos en el tumor (datos no mostrados). Un método alternativo para redirigir las células T al tumor es recubrir las células T α FITC-CAR con FITC-Ctx antes de la transferencia adaptativa.

Experimento 4. Se examinó la capacidad de las células T α FITC-CAR para destruir un tumor pancreático establecido. Los tumores pancreáticos crecieron hasta tamaños entre 3-10 mm² cuando los tumores estaban bien vascularizados y luego se inyectaron (ip) con FITC-Ctx o Ctx. Un día después, a los ratones se les administraron células T α FITC-CAR mediante inyección en la vena de la cola. Las células T con especificidad redirigida para EGFR erradicaron los tumores pancreáticos establecidos en todos los ratones (Figura 3C, panel izquierdo) y mejoraron la supervivencia en comparación con los ratones tratados con células T Ctx y α FITC-CAR (Figura 3C, panel derecho). No hubo recaída tumoral durante el tiempo de observación.

En resumen, estos estudios son los primeros en describir la generación de un sistema de CAR universal y adaptable que confiere especificidad de células T a anticuerpos marcados con FITC que cuando se unen a varios tipos de cáncer median la destrucción del tumor. Este informe también es el primero en enfatizar la importancia de usar células T CAR para atacar a más de un TAA, ya que pueden surgir variantes tumorales negativas para TAA y eventualmente matar al huésped. La plataforma se considera un sistema listo para usar que avanza considerablemente la tecnología CAR existente a través de su potencial para atacar a una variedad de proteínas etiquetadas (es decir, anticuerpos) para atacar a varios tipos de cáncer.

Otras realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la consideración de la especificación y la práctica de la invención descrita en el presente documento. Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren solo a modo de ejemplo, con el verdadero alcance de la invención indicado por las siguientes reivindicaciones.

Listado de secuencias

<110> DAVILA, Eduardo
TAMADA, Koji

<120> CÉLULAS T QUE EXPRESAN AL RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO ANTIETIQUETA UNIVERSAL Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

<130> 58873

<150> US 61/422.681
<151> 14/12/2010

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 815
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia anti-FITC-CAR sintetizada químicamente

<400> 1

```

agttgcctgt taggttggtg gtgctgatgt tctggattcc tgcttccagc agtgatgtcg      60
tgatgaccca aactccactc tccctgcctg tcagtccttg agatcaagcc tccatctctt      120
gcagatctag tcagagcctt gtacacagta atggaaacac ctatttacgt tggtaacctgc      180
agaagccagg ccagtcctcca aaggctctga tctacaaagt ttccaaccga ttttctgggg      240
tccagacag gttcagtggc agtggatcag gacacagatt cacactcaag atcagcagag      300
tggaggctga ggatctggga gtttatttct gctctcaaag tacacatggt ccgtggacgt      360
tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaaa gtagtgctga tgatgctaag aaggatgctg      420
ctaagaagga tgatgctaag aaggatgatg ctaagaagga tggtgagggtg aagctggatg      480
agactggagg aggcttggtg caacctggga ggcccatgaa actctcctgt gttgcctctg      540
gattcacttt tagtgactac tggatgaact gggtcogcca gtctccagag aaaggactgg      600
agtgggtagc acaaattaga aacaaacctt ataattatga aacatattat tcagattctg      660
tgaaaggcag attcaccatc tcaagagatg attccaaaag tagtgtctac ctgcaaatga      720
acaacttaag agttgaagac atgggtatct attactgtac gggttcttac tatggtatgg      780
actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcc      815

```

35

REIVINDICACIONES

1. Una o más formulaciones de proteínas etiquetadas y una o más poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan el receptor de antígeno quimérico antietiqueta (AT-CAR), en las que la proteína es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de la misma que se une a un antígeno asociado a tumor (TAA) y las proteínas de cada formulación de proteínas etiquetadas son iguales o diferentes y los AT-CAR de cada población de células T que expresan AT-CAR son iguales o diferentes y el AT-CAR comprende un dominio de unión a la etiqueta, un dominio transmembrana y un dominio de activación de células T, en el que las células T que expresan AT-CAR se unen a la etiqueta de las proteínas etiquetadas e inducen la muerte de las células cancerosas, para usar en una terapia de combinación para tratar el cáncer en un sujeto en el que dichas una o más formulaciones de proteínas etiquetadas y dichas una o más poblaciones de células T que expresan (AT-CAR), se administran ambas al sujeto tratando así el cáncer en el sujeto.
2. Las una o más formulaciones de proteínas etiquetadas y una o más poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en las que dichas una o más formulaciones de proteínas etiquetadas son al menos dos formulaciones de células etiquetadas y dichas una o más poblaciones de células T son al menos dos poblaciones de células T.
3. Las una o más formulaciones de proteínas etiquetadas y una o más poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en las que la etiqueta de cada formulación de proteínas etiquetadas es igual o diferente y la etiqueta se selecciona del grupo que consiste en isotiocianato de fluoresceína (FITC), estreptavidina, biotina, histidina, dinitrofenol, complejo de proteína peridrina clorofila, proteína verde fluorescente, ficoeritrina (PE), peroxidasa de rábano picante, palmitoilación, nitrosilación, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y proteína de unión a maltosa.
4. Las una o más formulaciones de proteínas etiquetadas y una o más poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en las que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de los mismos es cetuximab, nimotuzumab, panitumumab, rituximab, omalizumab, tositumomab, trastuzumab, alemtuzumab, bevacuzimab o un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los mismos.
5. Las una o más formulaciones de proteínas etiquetadas y una o más poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en las que
- (i) el dominio de unión a etiqueta es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo; o
- (ii) el dominio de unión a etiqueta se une específicamente a FITC, biotina, PE, histidina o estreptavidina.
6. Las una o más formulaciones de proteínas etiquetadas y una o más poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en las que el fragmento de unión a antígeno es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv).
7. Las una o más formulaciones de proteínas etiquetadas y una o más poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en las que el dominio transmembrana es la bisagra y las regiones transmembrana de la cadena CD8 α humana.
8. Las una o más formulaciones de proteínas etiquetadas y una o más poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en las que el dominio de activación de células T comprende una o más de la región citoplasmática de CD28, la región citoplasmática de CD137 (41BB), OX40, HVEM, CD3 ζ y FcR ϵ .
9. Las una o más formulaciones de proteínas etiquetadas y una o más poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en las que las células T de cada población de células T que expresan AT-CAR son iguales o diferentes y en las que las células T se seleccionan del grupo que consiste en células T de cualquier ambiente de HLA de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células T aisladas de un explante de tumor del sujeto y células T intratumorales del sujeto.
10. Las una o más formulaciones de proteínas etiquetadas y una o más poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en las que las células T de cada población de células T que expresan AT-CAR consisten en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) HLA-A2+.
11. Las una o más formulaciones de proteínas etiquetadas y una o más poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en las que la formulación o formulaciones de proteínas etiquetadas se administran al sujeto,

(i) antes de la administración de la población o poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR;

(ii) simultáneamente con la administración de la población o poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR; o

5 (iii) después de la administración de la población o poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR.

10 12. Las una o más formulaciones de proteínas etiquetadas y una o más poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en las que la formulación o formulaciones de proteínas etiquetadas y la población o poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR se administrarán al sujeto en cualquier orden.

15 13. Las una o más formulaciones de proteínas etiquetadas y una o más poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en las que la unión de las células T que expresan AT-CAR a las proteínas etiquetadas induce la activación citolítica de las células T.

20 14. Las una o más formulaciones de proteínas etiquetadas y una o más poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en las que el sujeto es un humano.

25 15. Las una o más formulaciones de proteínas etiquetadas y una o más poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-14, en las que el fragmento de unión a antígeno es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que se une específicamente a FITC, biotina, PE, histidina o estreptavidina.

30 16. Uso de una o más formulaciones de proteínas etiquetadas como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y una o más poblaciones terapéuticamente eficaces de células T que expresan AT-CAR como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 10 o 15 para la preparación de un medicamento para tratar el cáncer en un sujeto, en el que dicho tratamiento es mediante un método como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1, 11, 12, 13 o 14.

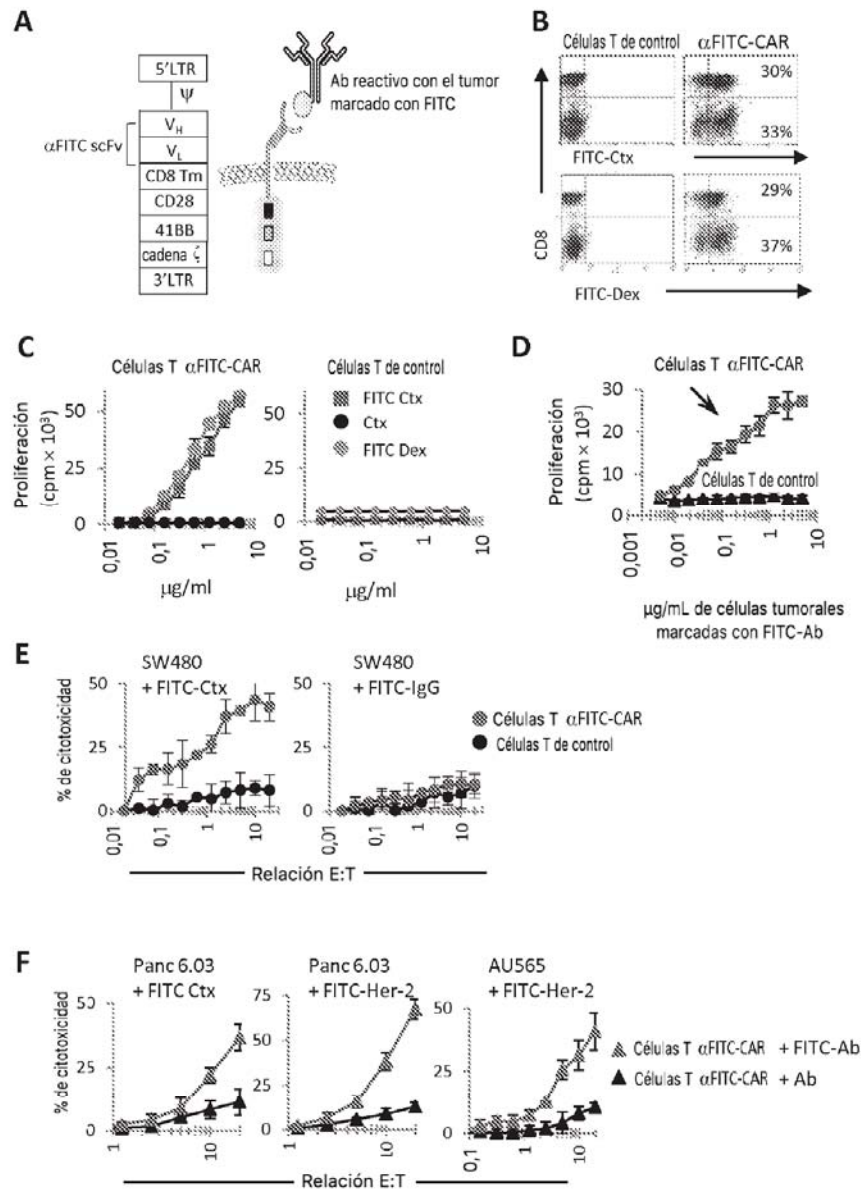


Figura 1. expresión de α FITC-CAR y funcionalidad in vitro

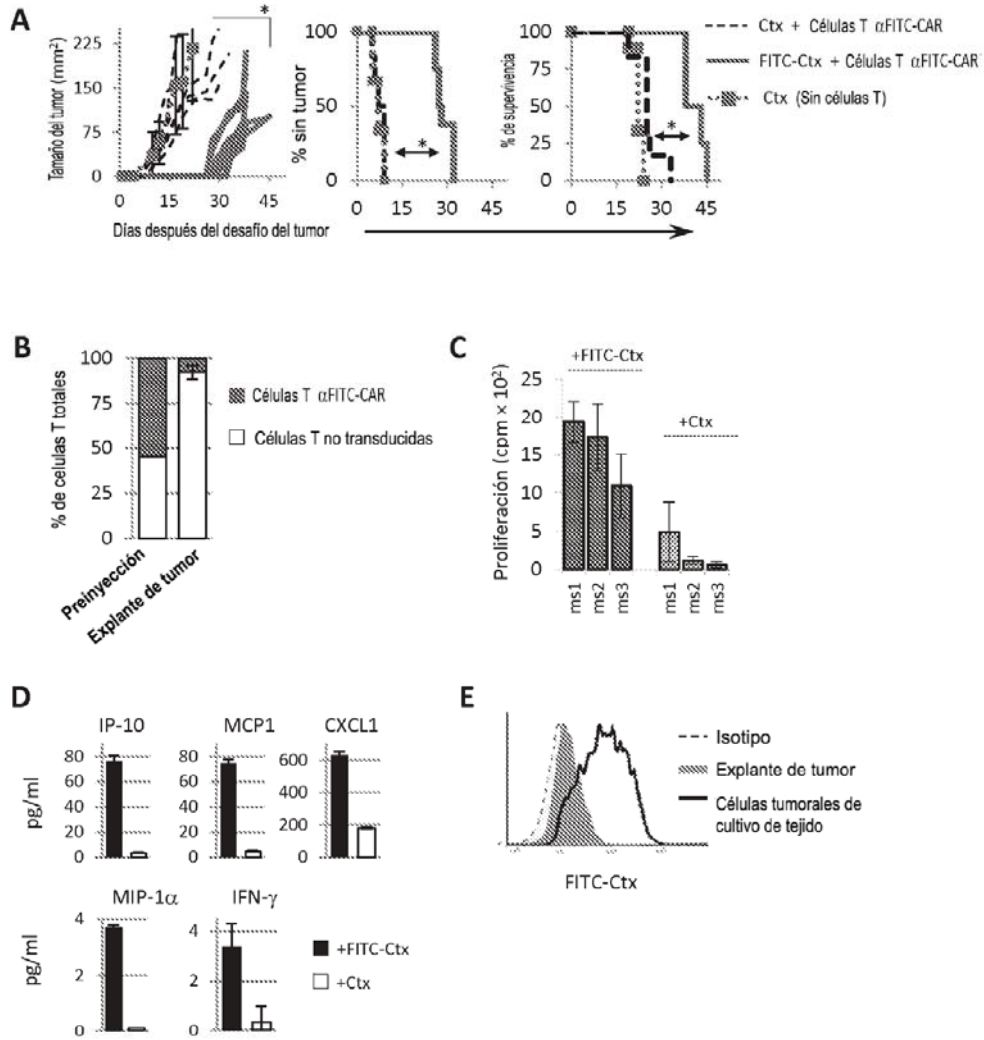


Figura 2. Las células T α FITC-CAR retrasan el establecimiento del tumor pero promueven la expansión de tumores negativos para antígeno

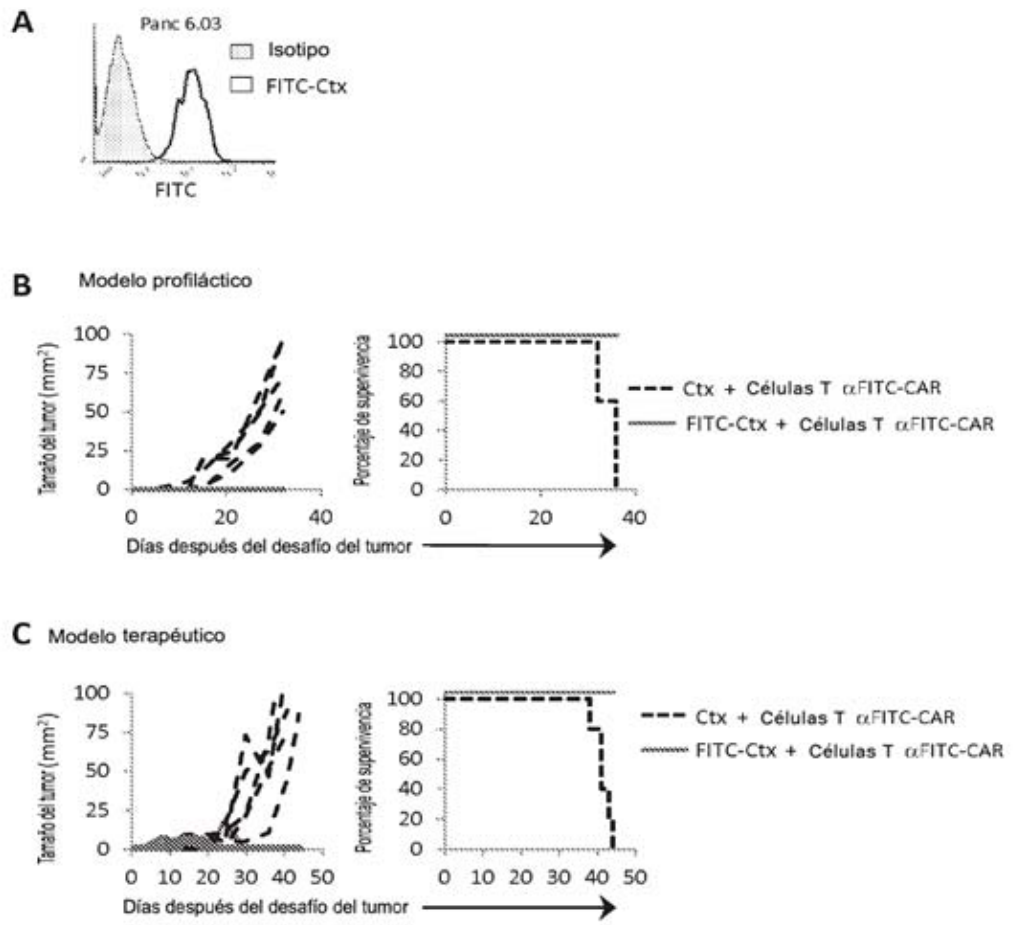


Figura 3. Las células T α FITC-CAR previenen el crecimiento del tumor y erradican los tumores establecidos