

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 126**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2015 PCT/US2015/059072**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2016 WO16073629**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2015 E 15795090 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 3215534**

54 Título: **Receptores de antígenos quiméricos (CAR) dirigidos de forma selectiva a complejos proteicos**

30 Prioridad:

05.11.2014 US 201462075627 P

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

16.02.2021

73 Titular/es:

**BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (100.0%)
210 West 7th Street
Austin, TX 78701, US**

72 Inventor/es:

**COOPER, LAURENCE J.N. y
JENA, BIPULENDU**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 806 126 T3

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

DESCRIPCIÓN

Receptores de antígenos quiméricos (CAR) dirigidos de forma selectiva a complejos proteicos

5 INCORPORACIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

El listado de secuencias contenido en el archivo llamado "UTFCP1250WO_ST25.txt", que es de 20 KB (medido en Microsoft Windows®) y fue creado el 27 de octubre de 2015, se presenta por este medio mediante envío electrónico.

10 Antecedentes de la invención**1. Campo de la invención**

En el presente documento se describen receptores de antígenos quiméricos (CAR), linfocitos T CAR y métodos de fabricación y uso de CAR y linfocitos T CAR.

2. Descripción de la técnica anterior

La potencia de los linfocitos T de calidad clínica se puede mejorar combinando la terapia génica con la inmunoterapia para diseñar un producto biológico con el potencial de (i) reconocimiento superior de antígenos asociados a tumores (AAT), (ii) persistencia después de la infusión, (iii) potencial de migración a sitios tumorales y (iv) capacidad para reciclar funciones efectoras dentro del microambiente tumoral. Dicha ingeniería genética de los linfocitos T se puede usar para redirigir la especificidad de las células y proporcionar composiciones terapéuticas que tienen actividad citotóxica dirigida al antígeno. Se ha demostrado que esta composición de linfocitos T diseñada es altamente efectiva para la intervención terapéutica en, por ejemplo, pacientes con cáncer (Jena *et al.*, 2010; Till *et al.*, 2008; Porter *et al.*, 2011; Brentjens *et al.*, 2011; Cooper y Bollard, 2012; Kalos *et al.*, 2011; Kochenderfer *et al.*, 2010; Kochenderfer *et al.*, 2012; Brentjens *et al.*, 2013). Sigue existiendo la necesidad de polipéptidos CAR y linfocitos T que expresan CAR que sean altamente específicos para antígenos, tales como complejos de proteínas, que están asociados con células enfermas concretas, tales como cánceres y sus subtipos. Davies *et al.*, *molecular medicine*, 2012, 565 - 576, describen el objetivo flexible de los dímeros ErbB que dirigen la tumorigénesis mediante el uso de linfocitos T genéticamente modificados.

Sumario de la invención

Las realizaciones de la invención son:

1. Un polipéptido del receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a antígeno; un dominio de bisagra; un dominio o dominios transmembrana y uno o más dominios de señalización celular intracelular, donde el dominio de unión a antígeno de dicho CAR comprende (i) un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina que comprende las secuencias de CDR: CDR1 (NIATDV, SEQ ID NO: 1); CDR2 (SASF, SEQ ID NO: 2); y CDR3 (SEPEPY, SEQ ID NO: 3); y (ii) un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende las secuencias de CDR: CDR1 (LSGDW, SEQ ID NO: 5); CDR2 (EISAAGGYTD, SEQ ID NO: 6); y CDR3 (ESRVSFEAAMDY, SEQ ID NO: 7), donde el polipéptido CAR se une de forma selectiva al complejo heterodimérico HER1/HER3.
2. El polipéptido CAR de la realización 1, donde el dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina es idéntico a la SEQ ID NO: 4.
3. El polipéptido CAR de una cualquiera de las realizaciones 1 o 2, donde el dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina es idéntico a SEQ ID NO:8.
4. El polipéptido CAR de la realización 1, donde el CAR comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO:9 o 10.
5. El polipéptido CAR de la realización 1, donde el CAR comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO:9 o 10.
6. El polipéptido CAR de la realización 1, donde el dominio bisagra comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:18.
7. El polipéptido CAR de la realización 1, donde el dominio transmembrana tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11 o la SEQ ID NO:12.
8. El polipéptido CAR de la realización 1, donde el dominio de señalización celular intracelular comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15.

9. Una célula inmunoefectora transformada que comprende un polipéptido CAR de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-8.
- 5 10. Una composición farmacéutica que comprende una población de células de acuerdo con la realización 9 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. Un linfocito T del receptor de antígeno quimérico (CAR) que expresa un polipéptido CAR de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-8 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 10 12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz antitumoral de una población de linfocitos T humanos, comprendiendo dichas células un polipéptido CAR de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-8.
- 15 13. La célula inmunoefectora transformada de la realización 9, donde la célula es un linfocito T, una célula NK, un linfocito T NK o un progenitor de linfocitos T.
14. La célula inmunoefectora transformada de la realización 9, que comprende además una citocina unida a la membrana.
- 20 15. La célula inmunoefectora transformada de la realización 14, donde la citocina unida a la membrana es IL-15 unida a la membrana.
16. El linfocito T CAR de la realización 11, para su uso en el tratamiento del cáncer de mama o cáncer de ovario.
- 25 17. El linfocito T CAR de la realización 11, para su uso en el tratamiento del melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer gástrico, cáncer colorrectal o cáncer pancreático.
18. El linfocito T CAR de la realización 11, para su uso en el tratamiento del cáncer que es resistente al trastuzumab o un tratamiento inhibidor de la tirosina quinasa.
- 30 19. La célula inmunoefectora transformada de la realización 9, donde la célula inmunoefectora se transforma con un vector viral o no viral que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido CAR de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-8.
- 35 20. La célula inmunoefectora transformada de la realización 19, donde el vector no viral comprende un sistema transposón transposasa Bella Durmiente.

En algunas realizaciones, los polipéptidos CAR y los linfocitos T CAR proporcionados en el presente documento permiten el direccionamiento altamente específico de células que expresan receptores HER1 HER3. Por tanto, en una primera realización, se proporciona un polipéptido del receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende (desde el extremo N al extremo C) un dominio de unión a antígeno, un dominio de bisagra, un dominio transmembrana y un dominio de señalización celular intracelular donde el CAR se une a HER1 y HER3 (cuando forman un heterodímero). En algunos aspectos, el dominio de unión a antígeno comprende un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina y un dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo que se une al heterodímero HER1 HER3. En aspectos adicionales, el scFv descrito en el presente documento, así como la unión del CAR derivado al heterodímero HER1-HER3, se produce mediante el reconocimiento específico de restos colocados a lo largo del heterodímero HER1-3. En algunos aspectos adicionales, el CAR comprende una secuencia enlazadora (por ejemplo, un enlazador Whitlow) entre el dominio variable de la cadena ligera y el dominio variable de la cadena pesada y o el primer y el segundo dominios scFv.

En algunos aspectos de las realizaciones, un dominio de bisagra de un CAR entendió los dominios bisagra, CH2 y CH3 de la IgG₄ humana. En aspectos adicionales, el dominio de señalización celular intracelular comprende un dominio de CD3ζ. En aspectos adicionales, el dominio de señalización celular intracelular también comprende un dominio intracelular de una molécula coestimuladora de linfocitos T, tal como CD28 o CD137. En otros aspectos adicionales, el dominio transmembrana de un CAR puede ser un dominio transmembrana de CD28 o CD137.

El dominio de unión a antígeno de un CAR comprende el dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina que incluye secuencias de CDR: CDR1 (NIATDV, SEQ ID NO: 1); CDR2 (SASF, SEQ ID NO: 2); y CDR3 (SEPEPY, SEQ ID NO:3).

El dominio de unión a antígeno de un CAR comprende el dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina puede comprender las secuencias de CDR: CDR1 (LSGDW, SEQ ID NO: 5); CDR2 (EISAAGGYTD, SEQ ID NO: 6); y CDR3 (ESRVS-FEAAMDY, SEQ ID NO:7).

En otros aspectos adicionales, el dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina está colocado en N-terminal en relación con el dominio variable de la cadena pesada. Por tanto, un CAR de las realizaciones puede

comprender los siguientes dominios (desde el extremo N al C) scFv-IgG₄-CH₃-CD137-CD3ζ de unión a HER1/HER3. En otros casos, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO:9. Como alternativa, el CAR puede comprender los siguientes dominios (desde el extremo N al C) scFv-IgG₄-CH₂-CH₃-CD28-CD3ζ de unión a HER1/HER3. En determinados aspectos, el CAR solo puede contener IgG₄-Bisagra-CH₃ solamente, por tanto está desprovisto del dominio CH₂. En algunos casos, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO:10.

Se ilustran las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido CAR de acuerdo con la primera realización anterior. En algunos aspectos, la secuencia que codifica el CAR está flanqueada por repeticiones de transposones (IR DR).

En otra realización adicional se proporciona una célula inmunoefectora aislada que comprende un polipéptido CAR de acuerdo con las realizaciones de la presente invención. En algunos aspectos, la célula es un linfocito T, una célula NK, un linfocito T NK o un progenitor de uno de estos tipos de células. En aspectos adicionales, la célula es una célula humana. Una realización adicional proporciona una composición farmacéutica que comprende una población de células de acuerdo con las realizaciones en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los linfocitos T CAR en la presente invención son, en una realización, para SU uso en el tratamiento del cáncer. Por tanto, en algunos aspectos, un sujeto para tratamiento tiene células enfermas que comprenden complejos proteicos que están unidos selectivamente por un CAR de las realizaciones. Por ejemplo, en algunos aspectos, un sujeto puede tener células enfermas que comprenden complejos HER1 HER3. En algunos aspectos, el sujeto tiene un cáncer, tal como un cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer gástrico, cáncer colorrectal o cáncer pancreático. En otros aspectos adicionales, se ha identificado que el sujeto tiene un cáncer que expresa heterodímeros de proteínas HER1-HER3. En determinados aspectos, el cáncer es resistente al menos a un primer agente terapéutico. Por ejemplo, el cáncer puede ser resistente al trastuzumab o a un tratamiento inhibidor de la tirosina quinasa. En otros aspectos adicionales, los linfocitos T se aislaron previamente del sujeto.

Se ilustra un método que comprende obtener una muestra de células que comprenden linfocitos T o progenitores de linfocitos T u otras células inmunoefectoras, tales como células NK o linfocitos T NK, transfectar las células con un ADN que codifica un polipéptido CAR de acuerdo con las realizaciones, para proporcionar una población de linfocitos T transgénicos que expresan CAR y cultivar la población de células transgénicas CAR *ex vivo* en un medio que mejora selectivamente la proliferación de linfocitos T que expresan CAR (por ejemplo, cocultivo con un sistema basado en células alimentadoras irradiadas). En determinados aspectos, el método comprende además la transfección de las células con un CAR flanqueado por transposones y una transposasa eficaz para integrar el ADN que codifica el CAR en el genoma de las células. En aspectos adicionales, un método comprende purificar o enriquecer células inmunoefectoras (por ejemplo, linfocitos T) en la muestra antes de la transfección. En ciertos casos, las células inmunoefectoras, tales como linfocitos T o progenitores de linfocitos T, derivan de células madre pluripotenciales inducidas o células madre embrionarias. En aspectos adicionales, el enriquecimiento de los linfocitos T en la muestra incluyó la recolección de una fracción de células mononucleares. La muestra de células puede ser de sangre del cordón umbilical, un órgano linfoide o una muestra de sangre periférica del sujeto en algunos casos. La muestra de células se puede obtener por aféresis o venopunción en algunos casos. En otros aspectos adicionales, la muestra de células es una subpoblación de linfocitos T. Las células CAR transgénicas se inactivan para la expresión de un receptor endógeno de linfocitos T y o HLA endógeno en algunos aspectos. La obtención de la muestra de células comprende la obtención de las células de un tercero en algunos aspectos adicionales.

En algunos aspectos, la transfección comprende la electroporación de ADN que codifica un transgén de CAR en el linfocito T. La transfección puede no implicar infectar o transducir las células con virus en algunos aspectos. En otros aspectos adicionales, las células se transfectan adicionalmente con un ácido nucleico que codifica una citocina Cy unida a la membrana. La citocina Cy unida a la membrana puede ser una IL-7, IL-15 o IL-21 unida a la membrana en algunos casos. En un aspecto específico, la citocina Cy unida a la membrana es la proteína de fusión IL-15-IL-15Rα.

En otros aspectos adicionales, el ADN que codifica el CAR es un plásmido. La transposasa puede proporcionarse como un vector de expresión de ADN, un ARNm, un polipéptido o un ARN expresable en algunos aspectos. En un aspecto específico, la transposasa es la transposasa (SB) de tipo salmónido similar a Tc1. En un aspecto específico adicional, la transposasa es la transposasa SB11 o SB100x.

Se ilustra el cultivo de las células CAR transgénicas de acuerdo con el método que comprende el cultivo de las células CAR transgénicas en presencia de células dendríticas o células presentadoras de antígenos artificiales (CPAa) o células alimentadoras similares que estimulan la expansión de los linfocitos T que expresan CAR. En determinados aspectos, las CPAa son células K562 transgénicas. En aspectos adicionales, las CPAa pueden comprender (i) los heterodímeros obligados de HER1, HER3 o HER1 y HER3; En otros aspectos adicionales, las CPAa comprenden un anticuerpo de unión a CAR o fragmento del mismo expresado en la superficie de las CPAa. Las CPAa pueden incluir moléculas adicionales que activan o coestimulan los linfocitos T en algunos casos. Las moléculas adicionales pueden comprender citocinas Cy unidas a membrana en algunos casos adicionales. En aún otros aspectos adicionales, las CPAa están inactivadas o irradiadas, o se han probado y confirmado que están libres

de material infeccioso. En otros aspectos adicionales, el cultivo de las células CAR transgénicas en presencia de CPAa comprende el cultivo de las células CAR transgénicas en un medio que comprende IL-21 y o IL-2. Las células pueden cultivarse en una relación de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10 (células CAR a CPAa) en ciertos casos.

5 En aún un aspecto adicional, el cultivo de la población de células CAR transgénicas es de no más de 7, 14, 21, 28, 35 o 42 días. En algunos casos, las células transgénicas no se cultivan *ex vivo* en presencia de CPAa. En algunos casos específicos, el método de la realización comprende además enriquecer la población celular para linfocitos T que expresan CAR después de la etapa de transfección o cultivo. El enriquecimiento puede comprender clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y clasificación de células que expresan CAR. En un aspecto adicional, la clasificación de las células que expresan CAR comprende el uso de un anticuerpo de unión a CAR. El enriquecimiento también puede comprender la depleción de las células CD56+. En aún otro aspecto adicional de la realización, el método comprende además criopreservar una muestra de la población de células CAR transgénicas.

15 En una realización adicional, se proporciona una población de linfocitos T CAR hecha por un método de una cualquiera de las realizaciones detalladas en el presente documento.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la descripción detallada siguiente. Las realizaciones de la invención están definidas por las reivindicaciones.

20 Breve descripción de los dibujos

Figura 1A-B - (A) Muestra un esquema de un polipéptido de receptor de antígeno quimérico (CAR) de ejemplo. El polipéptido de ejemplo incluye un dominio de unión a antígeno, un dominio de bisagra, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. (B) Análisis de citometría de flujo para mostrar la expresión de HER1-3 CAR en la superficie de los linfocitos T genéticamente modificados. El diagrama de flujo muestra la aparición de linfocitos T CAR+ el día 14 de cocultivo con K562 HLA^{Cnulo} irradiado que expresa un ligando activador de CAR. Las PBMC se electroporaron con ADN que codifica para HER1-HER3 CAR (que contiene señalización CD28 o CD137) y se propagaron sobre CPAa irradiadas (CPAu K562^{Cneg}) en una relación 1:2 de linfocitos T CAR y CPAu.

Figuras 2A-B - Expansión *ex vivo* de células HER1-3-CD28z CAR (A) y HER1-3-CD137z CAR (B) linfocitos CAR-T en CPAu K562^{Cneg} (CPA universal) que lleva un ligando CAR. Los linfocitos T CAR+ obtienen la señal de activación a través del tallo del CAR solo pero sin ninguna coestimulación de linfocitos T. La proliferación de linfocitos T CAR+ es subóptima en ausencia de antígeno y con una estimulación mínima de CPA (A). Los linfocitos T HER1-3 CD137z CAR+ mostraron una mejor proliferación y supervivencia sobre las CPA universales en comparación con los linfocitos T CAR que contienen el dominio de señalización CD28 (B).

Figuras 3A-C - (A) Detección de heterodímeros HER1-HER3 en una línea celular tumoral de cáncer de mama representativa y bien caracterizada, MDA-MB-231 (células fijadas), mediante ensayo de ligadura de proximidad *in situ* (Duolink®). Para detectar el heterodímero HER1 y HER3, dos anticuerpos primarios separados (criados en diferentes especies) contra HER1 y HER3 (se usaron Biologend junto con sondas y reactivos de PLA personalizados para la amplificación en círculo rodante (Sigma). Las señales de heterodímero HER1-3 se marcan como puntos precisos en la superficie celular. Los anticuerpos se valoraron previamente para reducir el ruido de fondo. Con fines de control, las células se trataron con un solo anticuerpo o con sondas PLA solamente (anti-conejo + y antiratón -). La detección se basó en la amplificación de señal capturada digitalmente a través del microscopio de fluorescencia (Leica DMI 6000). Las imágenes se analizaron usando un sistema de imágenes Metamorph™. Una vista ampliada se muestra en (B). (C) Los heterodímeros HER1-HER3 se mostraron en células adicionales de cáncer de mama SK-Br3 y MCF7 mediante un ensayo de ligadura de proximidad *in situ* (Duolink®).

Figuras 4A-4B. Expresión y funcionalidad de EGFR en una línea tumoral MDA-MB-231 BC de modelo. El EGFR se eliminó a nivel genómico en las células MDA-MB-231 mediante la herramienta de edición del genoma (CRISPR-Cas9). A continuación, se evaluaron las células para determinar la expresión de EGFR por citometría de flujo. (A) El análisis de citometría de flujo muestra histogramas que representan células MDA-MB-231 solo como control de fondo sin anticuerpo primario (línea de puntos; pico más a la izquierda), células MDA-MB-231 de tipo salvaje (pico más a la derecha) y células defectivas MDA-MB-231 EGFR^{knula} (pico central) teñidas con anticuerpo anti-EGFR (BD). (B) El análisis del gráfico de puntos confirma la regulación por disminución de EGFR en las células defectivas.

Figura 5 - La actividad citolítica específica de los linfocitos T CAR HER1-3 contra las células tumorales de mama se mostró después de un ensayo de liberación de cromo (CRA) de 4 horas *in vitro*. Los linfocitos T CAR+ se incubaron con objetivos tumorales marcados con cromo (⁵¹Cr) según el protocolo estándar. Las células objetivo se seleccionaron según el nivel de expresión de EGFR y HER3, la presencia de heterodímeros según lo confirmado por el ensayo de ligadura de proximidad basado en Duolink®. La especificidad de HER1-3 CAR se determinó mediante la lisis de múltiples líneas celulares BC con evidencia de presencia o falta de heterodímero

HER1-HER3. La lisis específica se calculó con una relación diferente de efector-objetivo (E:T). Los gráficos de datos mostraron que los linfocitos T-CAR HER1-3 mediaron la muerte de las células tumorales de mama. El nivel de expresión de HER1-3 se correlaciona positivamente con la citotoxicidad. Los gráficos de datos mostraron diferentes niveles de muerte en función de su expresión de HER1-3. Los linfocitos T-CAR específicos de HER1-3 exhibieron actividad citolítica específica contra células de cáncer de mama positivas para HER1-3.

Descripción detallada

Los ensayos clínicos han demostrado efectos antitumorales en ciertos pacientes que han recibido linfocitos T genéticamente modificados para tener la especificidad deseada. Por ejemplo, se ha demostrado que la terapia con linfocitos T-CAR proporciona una remisión significativa en pacientes humanos afectados por neoplasias malignas de células B avanzadas (Maude *et al.*, 2014). Esta situación clásica de muerte en serie (un linfocito T mata múltiples células tumorales sin experimentar anergia) se ha demostrado recientemente en varios pacientes tratados en varios ensayos de fase I (Corrigan-Curay *et al.*, 2014). Sin embargo, para mejorar la eficacia y reducir la toxicidad en el tejido fuera del objetivo causada por la acción de los linfocitos T-CAR, sigue existiendo la necesidad de rediseñar los CAR que puedan dirigirse a antígenos específicos de tumores concretos, tales como complejos de proteínas, que solo se pueden encontrar en tumores resistentes o malignos.

Los estudios del presente documento demuestran que los polipéptidos CAR pueden dirigirse selectivamente a complejos de proteínas que son específicos de las células tumorales (por ejemplo, complejos HER1 HER3 en el tumor de mama). Dichos CAR dirigidos selectivamente permiten el direccionamiento específico de células que tienen complejos receptores de superficie específicos, lo que puede reducir los posibles efectos fuera del objetivo de la terapia. Dichas células pueden ser particularmente útiles en el tratamiento de cánceres con señalización celular alterada (por ejemplo, a través de la activación del receptor o a través de cruzamiento del receptor) que conduce a la formación de células cancerosas que expresan heterodímeros de proteínas, tales como HER1-HER3. Esta alteración de la señalización permite que ciertos tumores desarrollen resistencia contra una terapia de otro modo eficaz, tal como la terapia con anticuerpos monoclonales (trastuzumab en el cáncer de mama, por ejemplo) o contra inhibidores de molécula pequeña, tales como inhibidores de la tirosina quinasa. Sin embargo, las células inmunoefectoras de las realizaciones podrían usarse para atacar específicamente tales células cancerosas alteradas.

En algunos aspectos de ejemplo, se ha demostrado que las secuencias de anticuerpos que se unen a los receptores HER1 HER3 (prominentes en ciertos tipos de cáncer) pueden adaptarse con éxito a un CAR para proporcionar linfocitos T CAR dirigido a HER1 HER3. Por tanto, estos nuevos polipéptidos CAR y linfocitos T que expresan los CAR se pueden usar para el direccionamiento específico de células cancerosas que tienen una elevada expresión de los heterodímeros de HER1 y HER3.

I. Definiciones

Como se usa en el presente documento, la especificación, "un" o "uno/una" pueden significar uno o más. Como se usa en el presente documento en la reivindicación o reivindicaciones, cuando se utiliza junto con la palabra "que comprende", las palabras "un" o "uno/una" pueden significar uno o más de uno.

El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para decir "y/o", a menos que se indique explícitamente que se refiera solo a alternativas o que las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición de que se refiere solo a alternativas y "y o". Como se usa en el presente documento, "otro" puede significar al menos un segundo o más.

A lo largo de la presente solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente del error para el dispositivo, usándose el método para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos de estudio.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "antígeno" es una molécula capaz de unirse a un anticuerpo o receptor de linfocito T. Un antígeno es además capaz de inducir una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria celular que conduce a la producción de los linfocitos B y/o T.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad antitumoral eficaz" se refiere a una cantidad eficaz de células inmunoefectoras que expresan CAR para reducir las células cancerosas o el crecimiento tumoral o para disminuir el volumen tumoral o el número de células tumorales en un sujeto. "Una cantidad antitumoral eficaz" también puede hacer referencia a una cantidad eficaz de células inmunoefectoras que expresan CAR para aumentar la esperanza de vida o para aliviar los efectos fisiológicos asociados con el tumor o el cáncer.

II. Receptores de antígenos quiméricos y componentes

Las moléculas receptoras de antígeno quimérico son proteínas de fusión recombinantes y se distinguen por su capacidad tanto para unirse al antígeno (por ejemplo, HER1 HER3) como para transducir señales de activación a

través de motivos de activación de inmunorreceptores (ITAM) presentes en sus colas citoplasmáticas. Las construcciones de receptor que utilizan un resto de unión a antígeno (por ejemplo, generado a partir de anticuerpos de cadena sencilla (scFv) ofrecen la ventaja adicional de ser "universales" en el sentido de que se unen al antígeno nativo en la superficie de la célula diana de manera independiente del HLA). Un polipéptido CAR de ejemplo se representa en el esquema proporcionado en la figura 1A.

Un receptor de antígeno quimérico según las realizaciones se puede producir por cualquier medio conocido en la técnica, aunque, preferentemente, se produce usando técnicas de ADN recombinante. Una secuencia de ácido nucleico que codifica las diversas regiones del receptor de antígeno quimérico puede prepararse y ensamblarse en una secuencia de codificación completa mediante técnicas estándar de clonación molecular (cribado de biblioteca genómica, PCR, ligadura asistida por cebador, bibliotecas de scFv de levaduras y bacterias, por mutagénesis dirigida, etc.). La región de codificación resultante puede insertarse en un vector de expresión y usarse para transformar una expresión adecuada de células inmunoefectoras alogénicas o autólogas del hospedador.

Las realizaciones de los CAR descritas en el presente documento incluyen ácidos nucleicos que codifican un polipéptido receptor de antígeno quimérico (CAR) específico de antígeno. En algunos aspectos, un polipéptido CAR de las realizaciones comprende un dominio de unión a antígeno, tal como un scFv, un dominio de señalización intracelular, un dominio transmembrana y un dominio extracelular que comprende uno o más motivos de señalización. En determinadas realizaciones, el CAR puede reconocer un epítipo compuesto por el espacio compartido entre uno o más antígenos (por ejemplo, un CAR puede unirse al complejo heterodimérico, pero tienen una afinidad reducida por los componentes individuales del complejo). En algunas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico comprende: a) un dominio de señalización intracelular, b) un dominio transmembrana y c) un dominio extracelular que comprende un dominio de unión a antígeno. En algunas realizaciones, un CAR puede comprender además un dominio de bisagra colocado entre el dominio transmembrana y el dominio de unión a antígeno. En determinados aspectos, un CAR de las realizaciones comprende además un péptido señal que dirige la expresión del CAR a la superficie celular. Por ejemplo, un CAR puede comprender un péptido señal de GM-CSF (véase, por ejemplo, SEQ ID NO:21).

En determinadas realizaciones, el CAR también se puede coexpresar con una citocina unida a la membrana para mejorar la persistencia cuando hay una baja cantidad de antígeno asociado al tumor. Por ejemplo, el CAR se puede coexpresar con IL-15 unida a la membrana.

A. Dominio de unión a antígeno

En determinadas realizaciones, una región de unión a antígeno puede comprender regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo monoclonal, regiones variables de un anticuerpo monoclonal, y o fragmentos de unión a antígeno del mismo. En otra realización, esa especificidad se obtiene de un péptido (por ejemplo, citocina) que se une a un receptor. Una región determinante de la complementariedad (CDR) es una secuencia de aminoácidos corta que se encuentra en los dominios variables de las proteínas del receptor de antígeno (por ejemplo, receptor de inmunoglobulina y de linfocitos T) que complementa un antígeno y, por lo tanto, proporciona al receptor su especificidad para ese antígeno en particular. Cada cadena polipeptídica de un receptor de antígeno contiene tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3). Dado que los receptores de antígeno están compuestos típicamente por dos cadenas polipeptídicas, hay seis CDR para cada receptor de antígeno que pueden entrar en contacto con el antígeno, cada cadena pesada y ligera contiene tres CDR. Debido a que la mayoría de las variaciones de secuencia asociadas con las inmunoglobulinas y los receptores de linfocitos T se encuentran en las CDR, estas regiones a veces se denominan dominios hipervariables. Entre estos, CDR3 muestra la mayor variabilidad ya que está codificado por una recombinación de las regiones VJ (VDJ en el caso de la cadena pesada y la cadena $\alpha\beta$ de TCR).

Se contempla que los ácidos nucleicos de CAR, en particular las secuencias scFv, son genes humanos para mejorar la inmunoterapia celular para pacientes humanos. En una realización específica, se proporciona un ADNc de CAR de longitud completo o una región de codificación. Las regiones o dominios de unión a antígeno pueden comprender un fragmento de las cadenas VH y VL de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) derivado de un ratón en particular, anticuerpo monoclonal humano o humanizado. El fragmento también puede ser cualquier número de dominios de unión a antígeno diferentes de un anticuerpo específico de antígeno. En una realización más específica, el fragmento es un scFv específico de antígeno codificado por una secuencia que está optimizada para el uso de codones humanos para la expresión en células humanas. En determinados aspectos, los dominios VH y VL de un CAR están separados por una secuencia enlazadora, tal como un enlazador Whitlow (véase, por ejemplo, SEQ ID NO:20).

En algunos ejemplos ilustrativos específicos, el dominio de unión a antígeno de un CAR es específico para la unión a un complejo heterodimérico. Los ejemplos de complejos heterodiméricos incluyen, entre otros, los complejos heterodiméricos CD19/CD10, CD19/CD22, CD19/ROR1, EGFR cMET, EGFR ROR1, GD2 ROR1 o HER1/HER3. En algunos aspectos ilustrativos, un sujeto puede tener células enfermas que comprenden los complejos heterodiméricos CD19/CD10, CD19/CD22, CD19/ROR1, EGFR/cMET, EGFR/ROR1, GD2/ROR1 o HER1/HER3.

En ciertas realizaciones del receptor de antígeno quimérico, la porción específica de antígeno del receptor (que

puede denominarse un dominio extracelular que comprende una región de unión a antígeno) comprende un dominio de unión a HER1 HER3 como se ha detallado en el presente documento anteriormente. En algunos aspectos, por ejemplo, el dominio de unión da HER1 HER3 comprende una de las secuencias proporcionadas en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2012/0121596.

5

B. Dominio de bisagra

En determinados aspectos, el tallo de un polipéptido CAR de las realizaciones puede incluir un dominio de bisagra colocado entre el dominio de unión a antígeno y el dominio transmembrana. En algunos casos, se puede incluir un dominio de bisagra en los polipéptidos CAR para proporcionar una distancia adecuada entre el dominio de unión a antígeno y la superficie celular o para aliviar el posible impedimento estérico que podría afectar negativamente a la unión al antígeno o a la función efectora de los linfocitos T modificados con el gen CAR.

10

En algunos casos, el dominio de bisagra CAR se puede derivar de la región constante de inmunoglobulina humana (Ig) o una porción de la misma que incluye la bisagra de Ig, o del dominio transmembrana α CD8 humano y la región bisagra CD8a. En un aspecto, el dominio de bisagra de CAR puede comprender una región bisagra-CH₂-CH₃ del isotipo de anticuerpo IgG₄. En algunos aspectos, las mutaciones puntuales se pueden introducir en el dominio CH₂ de la cadena pesada del anticuerpo para reducir la glicosilación y la unión no específica del receptor Fc gamma de los linfocitos T-CAR o cualquier otra célula modificada con CAR.

15

20

En ciertos aspectos específicos, el dominio de bisagra comprende una secuencia un 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a un dominio IgG4-Fc de la SEQ ID NO:16 o la SEQ ID NO:17, un dominio extracelular CD8a de SEQ ID NO:18 o una secuencia de bisagra sintética de SEQ ID NO:19.

25

C. Dominio transmembrana

El dominio extracelular específico de antígeno y el dominio de señalización intracelular pueden estar unidos por un dominio transmembrana. Las secuencias polipeptídicas que pueden usarse como parte del dominio transmembrana incluyen, sin limitación, el dominio CD4 transmembrana humano, el dominio CD28 transmembrana humano, el dominio CD3 ζ transmembrana humano o un dominio CD3 ζ humano mutado en cisteína, u otros dominios transmembrana de otras proteínas de señalización transmembrana humanas, tales como CD16 y CD8 y el receptor de eritropoyetina. En algunos aspectos, por ejemplo, el dominio transmembrana incluía una de las secuencias proporcionadas en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2014/0274909 o en la patente de Estados Unidos n.º 8,906,682, ambas incorporadas en el presente documento como referencia. En ciertos aspectos específicos, el dominio transmembrana puede ser un 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a un dominio CD8 α transmembrana de la SEQ ID NO:11 o un dominio CD28 transmembrana de la SEQ ID NO:12.

30

35

D. Dominio de señalización intracelular

El dominio de señalización intracelular del receptor de antígeno quimérico de las realizaciones es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria diseñada para expresar un receptor de antígeno quimérico. La expresión "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula diferenciada. La función efectora de un linfocito T, por ejemplo, puede ser la actividad citolítica o la actividad colaboradora, incluida la secreción de citocinas. La función efectora en linfocito T intacto, de memoria o de tipo memoria incluye la proliferación dependiente de antígeno. Por lo tanto, la expresión "dominio de señalización intracelular" se refiere a la parte de una proteína que transduce la señal de la función efectora y dirige a la célula a realizar una función especializada. En algunos aspectos, el dominio de señalización intracelular se deriva del dominio de señalización intracelular de un receptor nativo. Los ejemplos de tales receptores nativos incluyen la cadena zeta del receptor de linfocitos T o cualquiera de sus homólogos (por ejemplo, eta, delta, gamma o epsilon), cadena MB1, B29, Fc RIII, Fc RI, y combinaciones de moléculas de señalización, tales como CD3 ζ y CD28, CD27, 4-1BB, DAP-10, OX40 y combinaciones de los mismos, así como otras moléculas y fragmentos similares. Pueden usarse porciones de señalización intracelular de otros miembros de las familias de proteínas activadoras, tales como Fc γ RIII y Fc ϵ RI. Véase Gross *et al.* (1992), Stancovski *et al.* (1993), Moritz *et al.* (1994), Hwu *et al.* (1995), Weijtens *et al.* (1996) y Hekele *et al.* (1996) para divulgaciones de receptores de linfocitos T usando estos dominios transmembrana e intracelulares alternativos. Si bien generalmente se usará todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario utilizar todo el polipéptido intracelular. En la medida en que puede ser útil una porción truncada del dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada se puede usar en lugar de la cadena intacta siempre que transduzca la señal de la función efectora. Por lo tanto, con la expresión "dominio de señalización intracelular" se pretende incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de función efectora tras la unión de CAR a un objetivo. En una realización preferida, el dominio CD3 ζ intracelular humano se usa como el dominio de señalización intracelular para un CAR de las realizaciones.

40

45

50

55

60

65

En realizaciones específicas, los dominios de señalización de receptores intracelulares en el CAR incluyen los del complejo del receptor de antígeno de linfocitos T, tal como la cadena ζ de CD3, asimismo, los dominios de

señalización coestimuladores Fcγ RIII, CD28, CD27, DAP10, CD137, OX40, CD2, solos o en serie con CD3ζ, por ejemplo. En realizaciones específicas, el dominio intracelular (que puede denominarse dominio citoplasmático) comprende parte o la totalidad de una o más de la cadena de TCRζ, CD28, CD27, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, FcεRIγ, ICOS/CD278, IL-2Rβ/CD122, IL-2Rα/CD132, DAP10, DAP12 y CD40. En algunas realizaciones, se emplea cualquier parte del complejo receptor de linfocitos T endógeno en el dominio intracelular. Se pueden emplear uno o múltiples dominios citoplasmáticos, dado que los llamados CAR de tercera generación tienen al menos dos o tres dominios de señalización fusionados para obtener un efecto aditivo o sinérgico, por ejemplo.

En algunas realizaciones, el CAR incluía otros dominios coestimuladores adicionales. Otros dominios coestimuladores pueden incluir, pero sin limitaciones, uno o más de CD28, CD27, OX-40 (CD134), DAP10 y 4-1BB (CD137). Además de una señal primaria iniciada por CD3ζ, una señal adicional proporcionada por un receptor coestimulador humano insertado en un CAR humano es importante para la activación completa de los linfocitos T y podría ayudar a mejorar la persistencia *in vivo* y el éxito terapéutico de la inmunoterapia adoptiva.

En ciertos aspectos específicos, el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia un 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a un dominio CD3ζ intracelular de SEQ ID NO:13, un dominio CD28 intracelular de SEQ ID NO:14 o un dominio CD137 intracelular de SEQ ID NO:15.

III. Vectores e ingeniería celular

En realizaciones particulares, se proporcionan segmentos de ácido nucleico aislados y casetes de expresión que incorporan secuencias de ADN que codifican un CAR. Como apreciará un experto en la técnica, en algunos casos, se pueden delecionar algunos aminoácidos en los extremos del dominio de unión a antígeno en el CAR sin afectar ni a la especificidad ni a la afinidad de unión del efector de la molécula, generalmente, no más de 10, más generalmente no más de 5 restos, por ejemplo. Asimismo, puede ser deseable introducir una pequeña cantidad de aminoácidos en los extremos, generalmente, no más de 10, más generalmente no más de 5 restos. La delección o inserción de aminoácidos puede ser el resultado de las necesidades de la construcción, que proporciona sitios de restricción convenientes, facilidad de manipulación, mejora de los niveles de expresión o similares. Además, la sustitución de uno o más aminoácidos por un aminoácido diferente puede ocurrir por razones similares, generalmente, no sustituyendo más de aproximadamente 5 aminoácidos en uno cualquiera de los dominios.

La construcción quimérica que codifica el receptor de antígeno quimérico de acuerdo con las realizaciones se puede preparar de manera convencional. Por ello, en su mayor parte, pueden emplearse secuencias naturales, los genes naturales pueden aislarse y manipularse, según sea apropiado, para permitir la unión adecuada de los diversos componentes. Por tanto, las secuencias de ácido nucleico que codifican los componentes proteicos N-terminal y C-terminal del receptor de antígeno quimérico se pueden aislar mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que utiliza cebadores apropiados que dan como resultado la delección de las porciones no deseadas del gen. Como alternativa, se pueden utilizar fracciones digeridas por restricción de genes clonados para generar la construcción quimérica. En cualquier caso, las secuencias se pueden seleccionar para proporcionar sitios de restricción que tengan extremos romos o superposiciones complementarias.

Las diversas manipulaciones para preparar la construcción quimérica pueden llevarse a cabo *in vitro* y, en realizaciones particulares, la construcción quimérica se introduce en vectores para la clonación y la expresión en un hospedador apropiado utilizando métodos estándar de transformación o transfección. Por tanto, después de cada manipulación, la construcción resultante de la unión de las secuencias de ADN se clona, el vector se aísla y la secuencia se selecciona para asegurar que la secuencia codifica el receptor de antígeno quimérico deseado. La secuencia se puede seleccionar mediante análisis de restricción, secuenciación o similares.

Se han diseñado vectores de las realizaciones, principalmente, para liberar los genes deseados a las células inmunitarias, preferentemente linfocitos T, bajo el control de promotores eucariotas regulados, por ejemplo, el promotor de MNDU3, el promotor del CMV, el promotor de EF1α, o el promotor de la ubiquitina. Asimismo, los vectores pueden contener un marcador seleccionable, si por ninguna otra razón, para facilitar su manipulación *in vitro*. En otras realizaciones, el CAR puede expresarse a partir de ARNm *in vitro* transcrito a partir de un molde de ADN.

En un ejemplo de construcción de ácido nucleico (polinucleótido) empleado de acuerdo con las realizaciones, el promotor está unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico de las realizaciones, es decir, está colocado de manera que estimule la transcripción del ARN mensajero del ADN que codifica el receptor de antígeno quimérico. El promotor puede ser de origen genómico o generarse sintéticamente. En la técnica se conocen diversos promotores para su uso en linfocitos T (por ejemplo, el promotor CD4 desvelado por Marodon, et al. (2003)). El promotor puede ser constitutivo o inducible, donde la inducción está asociada con el tipo de célula específico o un nivel específico de maduración por ejemplo. Como alternativa, también son adecuados varios promotores virales bien conocidos. Los promotores de interés incluyen el promotor de la β-actina, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor de inmunoglobulina, el promotor de citomegalovirus humano, el promotor de retrovirus y el promotor del virus de Friend formador de foco en el bazo. Los promotores pueden o no estar asociados con potenciadores, en los que los potenciadores pueden estar asociados de forma

natural con el promotor concreto o asociados con un promotor diferente.

La secuencia del marco de lectura abierto que codifica el receptor de antígeno quimérico se puede obtener a partir de una fuente de ADN genómico, una fuente de ADNc, o puede sintetizarse (por ejemplo, mediante PCR), o combinaciones de los mismos. Dependiendo del tamaño del ADN genómico y el número de intrones, puede ser deseable utilizar ADNc o una combinación de los mismos, ya que se encuentra que los intrones estabilizan el ARNm o proporcionan expresión específica de linfocitos T (Barthel y Goldfeld (2003)). Asimismo, también puede ser ventajoso utilizar regiones no codificantes endógenas o exógenas para estabilizar el ARNm.

Para la expresión de un receptor de antígeno quimérico de las realizaciones, la región de iniciación de la transcripción endógena o de origen natural de la secuencia de ácido nucleico que codifica componentes N-terminales de, por ejemplo, se puede usar un receptor de linfocitos T para generar el receptor de antígeno quimérico en el hospedador objetivo. Como alternativa, se puede utilizar una región de iniciación de la transcripción exógena que permita la expresión constitutiva o inducible, donde la expresión se puede controlar dependiendo del hospedador objetivo, el nivel de expresión deseado, la naturaleza del hospedador diana y similares.

De manera análoga, una secuencia señal que dirige el receptor de antígeno quimérico a la membrana superficial puede ser la secuencia señal endógena del receptor de linfocitos T. Opcionalmente, en algunos casos, puede ser deseable intercambiar esta secuencia por una secuencia señal diferente. Sin embargo, la secuencia señal seleccionada debe ser compatible con la vía secretora de los linfocitos T para que el receptor de antígeno quimérico se presente en la superficie del linfocito T.

De manera similar, una región de terminación puede ser proporcionada por la región de terminación de la transcripción endógena o de origen natural para una subunidad del receptor de linfocitos T. Como alternativa, la región de terminación puede proceder de una fuente diferente. En su mayor parte, la fuente de la región de terminación generalmente no se considera crucial para la expresión de una proteína recombinante y se puede emplear una amplia variedad de regiones de terminación sin afectar de forma adversa a la expresión.

Se contempla que la construcción DE CAR se puede introducir en las propias células del sujeto (o en células de un sujeto donante diferente) como ADN desnudo o en un vector adecuado. Los métodos para transfectar establemente linfocitos T mediante electroporación utilizando ADN desnudo son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, La patente de Estados Unidos n.º 6.410.319, el ADN desnudo generalmente se refiere al ADN que codifica un receptor de antígeno quimérico de las presentes realizaciones contenidas en un vector de expresión plasmídico en la orientación adecuada para la expresión. Ventajosamente, el uso de ADN desnudo puede reducir el tiempo requerido para producir linfocitos T que expresan el receptor de antígeno quimérico de las realizaciones.

En aspectos adicionales, las construcciones de CAR se pueden introducir en las células utilizando un sistema basado en transposones para mediar la integración de la construcción de CAR en el ADN genómico de las células. En general, dichos métodos implicarán introducir en las células (i) un primer vector que codifica la transposasa (o un polipéptido de la transposasa) y (ii) un segundo vector que codifica un elemento genético deseado que está flanqueado por repeticiones de transposones. Los transposones o elementos transponibles incluyen una secuencia (corta) de ácido nucleico con secuencias de repetición terminales aguas arriba y aguas abajo de las mismas y codifican enzimas que facilitan la escisión e inserción del ácido nucleico en secuencias de ADN objetivo. Se han adaptado varios sistemas de transposones transposasas para inserciones genéticas de secuencias de ADN heterólogas, incluyendo *Sleeping Beauty (SB)*, un elemento similar a Tc1 marino de peces que exhibe actividad de transposición en diversas líneas celulares cultivadas de vertebrados, células madre embrionarias e *in vivo* (Ivics *et al.*, 1997). Los sistemas de transposones y transposasas adicionales se proporcionan en las patentes de Estados Unidos n.º 6,489,458; 7,148,203; 8,227,432; la publicación de patente de Estados Unidos N.º 2011/0117072; Mates *et al.*, 2009 y en Ivics *et al.*, 1997.

Como alternativa, un vector viral (por ejemplo, un vector retroviral vector adenoviral, vector viral adenoasociado o vector lentiviral) puede usarse para introducir la construcción quimérica en los linfocitos T. Los vectores adecuados para su uso de acuerdo con el método de las realizaciones no se replican en los linfocitos T del sujeto. Se conoce un gran número de vectores que se basan en virus, donde el número de copias del virus que se mantiene en la célula es lo suficientemente bajo como para mantener la viabilidad de la célula. Los vectores ilustrativos incluyen los vectores pFB-neo (STRATAGENE®) desvelados en el presente documento, así como los vectores basados en VIH, SV40, EBV, HSV o BPV.

IV. Células inmunoefectoras

Se ilustran métodos para fabricar y o expandir las células inmunoefectoras redireccionadas específicas de antígeno (por ejemplo, linfocitos T, células NK o linfocitos T NK) que comprenden la transfección de las células con un vector de expresión que contiene una construcción de ADN (o ARN) que codifica el CAR, después, opcionalmente, la estimulación de las células con células alimentadoras, antígeno recombinante o un anticuerpo para el receptor que hace que las células proliferen. En determinados aspectos, la célula (o población celular) diseñada para expresar un CAR es una célula madre, célula iPS, célula inmunitaria o un precursor de estas células. Los métodos descritos a

continuación abordan el ejemplo específico de ingeniería de linfocitos T (u otras células inmunitarias) para la expresión de CAR.

5 Las fuentes de células inmunoefectoras incluyen fuentes alogénicas y autólogas. En algunos casos, las células
 inmunoefectoras pueden diferenciarse de las células madre o las células madre pluripotenciales inducidas (iPSC).
 Por tanto, las células inmunoefectoras de acuerdo con las realizaciones pueden aislarse de sangre del cordón
 umbilical, sangre periférica, células madre embrionarias humanas, o iPSC. Por ejemplo, los linfocitos T alogénicos
 pueden modificarse para incluir un receptor de antígeno quimérico (y, opcionalmente, para carecer de TCR
 funcional). En algunos aspectos, las células inmunoefectoras son linfocitos T humanos primarios, tales como
 10 linfocitos T derivados de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana, Las PBMC se obtienen
 después de la estimulación con G-CSF, de médula ósea o sangre del cordón umbilical. Después de la transfección o
 transducción (por ejemplo, con una construcción de expresión de CAR), las células pueden infundirse
 inmediatamente o pueden almacenarse. En determinados aspectos, después de la transfección, las células pueden
 propagarse durante días, semanas o meses *ex vivo* como una población masiva en un plazo de aproximadamente 1,
 15 2, 3, 4, 5 días o más después de la transferencia de genes a las células. En un aspecto adicional, después de la
 transfección, los transfectantes se clonan y un clon que demuestra la presencia de un solo casete o plásmido de
 expresión integrado o mantenido episómicamente, y la expresión del receptor de antígeno quimérico se expande *ex vivo*.
 El clon seleccionado para expansión demuestra la capacidad de reconocer y lisar específicamente las células
 diana que expresan el antígeno. Los linfocitos T recombinantes pueden expandirse mediante estimulación con IL-2 u
 20 otras citocinas que se unen a la cadena gamma común (por ejemplo, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 y otros). Los linfocitos T
 recombinantes pueden expandirse mediante estimulación con células presentadoras de antígeno artificiales. los
 linfocitos T recombinantes pueden expandirse en las células presentadoras de antígeno artificiales o con un
 anticuerpo, tal como OKT3, que cruza con CD3 en la superficie del linfocito T. Las subpoblaciones de los linfocitos T
 recombinantes pueden eliminarse en la célula presentadora de antígeno artificial o con un anticuerpo, tal como
 25 Campath, que se une a CD52 en la superficie del linfocito T. En un aspecto adicional, las células genéticamente
 modificadas pueden criopreservarse.

V. Método para propagar células inmunoefectoras

30 En algunos casos, las células inmunoefectoras de las realizaciones (por ejemplo, linfocitos T) se cultivan
 conjuntamente con células activadoras y propagadoras (CAyP), para ayudar en la expansión celular. Por ejemplo,
 las células presentadoras de antígeno (CPA) son útiles para preparar composiciones terapéuticas y productos de
 terapia celular de las realizaciones. Para orientación general sobre la preparación y uso de sistemas presentadores
 de antígeno, véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 6,225,042, 6,355,479, 6,362,001 y 6,790,662;
 35 las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2009/0017000 y 2009/0004142; y la publicación
 internacional n.º WO2007 103009.

En algunos casos, las CAyP se incuban con un péptido de una longitud óptima que permite la unión directa del
 péptido a la molécula de MHC sin procesamiento adicional. Como alternativa, las células pueden expresar un
 40 antígeno de interés (es decir, en el caso del reconocimiento de antígeno independiente de MHC). Adicionalmente, en
 algunos casos, las APC pueden expresar un anticuerpo que se une a un polipéptido CAR específico o a polipéptidos
 CAR en general (por ejemplo, una célula universal de activación y propagación (CPAu). Dichos métodos se desvelan
 en la publicación de patente internacional (PCT) n.º WO 2014/190273. Además de las moléculas de péptido-MHC o
 antígenos de interés, los sistemas de CAyP también pueden comprender al menos una molécula auxiliar exógena.
 45 Se puede emplear cualquier número y combinación adecuados de moléculas auxiliares. La molécula auxiliar puede
 seleccionarse de entre moléculas auxiliares, tales como moléculas coestimuladoras y moléculas de adhesión. Las
 moléculas coestimuladoras de ejemplo incluyen CD70 y B7.1 (B7.1 se conocía anteriormente como B7 y también
 como CD80), que, entre otras cosas, se unen a las moléculas CD28 y o CTLA-4 en la superficie de los linfocitos T,
 afectando de ese modo, por ejemplo, a la expansión de los linfocitos T, la diferenciación de Th1, la supervivencia a
 50 corto plazo de los linfocitos T y la secreción de citocinas, tales como interleucina (IL)-2 (véase Kim *et al.*, 2004). Las
 moléculas de adhesión pueden incluir glucoproteínas de unión a carbohidratos, tales como selectinas, glicoproteínas
 de unión transmembrana, tales como integrinas, proteínas dependientes de calcio, tales como cadherinas, y
 proteínas de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) transmembrana de un solo paso, tales como moléculas de
 adhesión intercelular (ICAM), que estimulan, por ejemplo, el contacto de célula a célula o de célula a matriz. Las
 55 moléculas de adhesión de ejemplo incluyen LFA-3 e ICAM, tal como ICAM-1. Las técnicas, métodos y reactivos
 útiles para la selección, clonación, preparación y expresión de moléculas auxiliares de ejemplo, incluyendo
 moléculas coestimuladoras y moléculas de adhesión, se ilustran en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º
 6,225,042, 6,355,479 y 6,362,001.

60 Las células seleccionadas para convertirse en CAyP, tienen, preferentemente, deficiencias en el procesamiento de
 antígeno intracelular, el tráfico de péptidos intracelulares, y o la carga péptido-molécula de MHC de clase I o de
 clase II intracelulares o son poiquilotérmicos (es decir, menos sensibles a la exposición a la temperatura que las
 líneas celulares de mamíferos) o poseen deficiencias y propiedades poiquilotérmicas. Preferentemente, las células
 seleccionadas para convertirse en CAyP también carecen de la capacidad de expresar al menos un homólogo
 65 endógeno (por ejemplo, molécula de MHC de clase I o de clase II endógena y o moléculas auxiliares endógenas
 como se ha descrito anteriormente) a la molécula de MHC de clase I o de clase II exógena y componentes de la

molécula auxiliar que se introducen en las células. Adicionalmente, las CAyP conservan, preferentemente, las deficiencias y las propiedades poiquilotérmicas que poseían las células antes de su modificación para generar las CAyP. Las CAyP de ejemplo constituyen o se derivan de un transportador asociado con la línea celular deficiente en el procesamiento de antígeno (TAP), tal como una línea celular de insecto. Una línea de células de insecto poiquilotérmico de ejemplo es una línea celular de *Drosophila*, tal como una línea celular Schneider 2 (véase, por ejemplo, Schneider 1972 Illustrative methods for the preparation, growth, and culture of Schneider 2 cells, se proporcionan en las patentes de Estados Unidos n.º 6,225,042, 6,355,479 y 6,362,001.

En una realización, las CAyP también se someten a un ciclo de congelación-descongelación. En un ciclo de congelación-descongelación de ejemplo, las CAyP pueden congelarse poniendo en contacto un recipiente adecuado que contenga las CAyP con una cantidad apropiada de nitrógeno líquido, dióxido de carbono sólido (es decir, hielo seco) o material similar a baja temperatura, de modo que la congelación se produce rápidamente. A continuación, las CPA congeladas se descongelan, ya sea mediante la eliminación de las CAyP del material a baja temperatura y la exposición a condiciones de temperatura ambiente, o mediante un proceso de descongelación facilitada en el que se emplea un baño de agua tibia o una mano tibia para facilitar un tiempo de descongelación más corto. Además, las CAyP pueden congelarse y almacenarse durante un período prolongado de tiempo antes de descongelar. Las CAyP congelados también pueden descongelarse y, después, liofilizarse antes de su uso posterior. Preferentemente, los conservantes que podrían afectar negativamente a los procedimientos de congelación-descongelación, tal como dimetilsulfóxido (DMSO), polietilenglicoles (PEG) y otros conservantes, están ausentes de los medios que contienen CAyP que sufren el ciclo de congelación-descongelación, o se eliminan esencialmente, tal como mediante la transferencia de CAyP a los medios que están esencialmente desprovistos de dichos conservantes.

En realizaciones adicionales, el ácido nucleico xenogénico y el ácido nucleico endógeno a las CAyP, pueden inactivarse mediante reticulación, para que esencialmente no haya crecimiento celular, replicación o expresión del ácido nucleico después de la inactivación. En una realización, las CAyP se inactivan en un punto posterior a la expresión de MHC exógeno y moléculas auxiliares, la presentación de tales moléculas sobre la superficie de las CAyP y la carga de las moléculas de MHC presentadas con péptido o péptidos seleccionados. Por consiguiente, dichas CAyP inactivadas y cargadas con el péptido seleccionado, aunque se vuelven esencialmente incapaces de proliferar o replicarse, retienen la función de presentación del péptido seleccionado. Preferentemente, la reticulación también produce CAyP que están esencialmente libres de microorganismos contaminantes, tales como bacterias y virus, sin disminuir sustancialmente la función celular presentadora de antígeno de las CAyP. Por lo tanto, la reticulación mantiene las funciones importantes de las CAyP y al mismo tiempo ayuda a aliviar los problemas sobre la seguridad de un producto de terapia celular desarrollado utilizando las CAyP. Para los métodos relacionados con la reticulación y las CAyP, véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20090017000.

En determinados casos, las células modificadas con CAR pueden clasificarse según su fuerza mitocondrial (o el contenido total de mitocondrias de las células) empleando una proteína indicadora fluorescente usando FACS antes de su uso como agente terapéutico.

VI. Aplicación terapéutica

En algunos aspectos, las construcciones de receptor de antígeno quimérico de las realizaciones encuentran aplicación en sujetos que tienen o se sospecha que tienen cáncer al reducir el tamaño de un tumor o prevenir el crecimiento o la reaparición de un tumor en estos sujetos. Por consiguiente, las realizaciones proporcionadas en el presente documento se refieren además a un método para reducir el crecimiento o prevenir la formación de tumores en un sujeto mediante la introducción de una construcción del receptor de antígeno quimérico de las presentes realizaciones en un linfocito T aislado del sujeto y reintroducción en el sujeto del linfocito T transformado, efectuando así respuestas antitumorales para reducir o eliminar tumores en el sujeto. Los linfocitos T adecuados que pueden usarse incluyen linfocitos citotóxicos (CTL) o cualquier célula que tenga un receptor de linfocitos T que necesite alteración. Como es bien sabido por un experto en la técnica, hay varios métodos disponibles para aislar estas células de un sujeto. Por ejemplo, usando la expresión del marcador de la superficie celular o usando kits disponibles comercialmente (por ejemplo, ISOCELL™ de Pierce, Rockford, Ill.).

Una vez que se establece que la célula inmunoefectora transfectada o transducida (por ejemplo, linfocito T) es capaz de expresar el receptor de antígeno quimérico como una proteína de membrana de superficie con la regulación deseada y en un nivel deseado, se puede determinar si el receptor de antígeno quimérico es funcional en la célula hospedadora para proporcionar la inducción de señal deseada. Posteriormente, las células inmunoefectoras transducidas se reintroducen o administran al sujeto para activar respuestas antitumorales en dicho sujeto. Para facilitar la administración, los linfocitos T transducidos de acuerdo con las realizaciones se pueden convertir en una composición farmacéutica o en un implante apropiado para la administración *in vivo*, con vehículos o diluyentes apropiados, que además pueden ser farmacéuticamente aceptables. Los medios para hacer dicha composición o un implante se han descrito en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed., Mack, ed. (1980)). Cuando sea apropiado, los linfocitos T transducidos se pueden formular en una preparación en forma semisólida o líquida, tal como una cápsula, solución, inyección, inhalador o aerosol, en las formas habituales por su vía de administración respectiva. Se pueden utilizar medios conocidos en la técnica para prevenir o minimizar la

liberación y absorción de la composición hasta que alcance el tejido u órgano diana, o para asegurar la liberación programada de la composición. Deseablemente, sin embargo, se usa una forma farmacéuticamente aceptable que no afecta a las células que expresan el receptor de antígeno quimérico. Por tanto, deseablemente, los linfocitos T transducidos se pueden convertir en una composición farmacéutica que contiene una solución salina equilibrada, preferentemente, solución salina equilibrada de Hanks, o solución salina normal.

En determinadas realizaciones, las células que expresan CAR de las realizaciones se administrarán a un individuo que las necesite, tal como un individuo que tiene cáncer o una infección. A continuación, las células potencian el sistema inmunitario del individuo para que ataque a las respectivas células de cáncer o infectadas por un patógeno. En algunos casos, el individuo recibe una o más dosis de las células CAR específicas de antígeno. En los casos en los que el individuo recibe dos o más dosis de las células de CAR específicas de antígeno, la duración entre las administraciones debería ser suficiente para permitir el tiempo de propagación en el individuo, y, en realizaciones específicas, la duración entre dosis es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días. Las dosis adecuadas para un efecto terapéutico serían al menos 10^5 o entre aproximadamente 10^5 y aproximadamente 10^{10} células por dosis, por ejemplo, preferentemente en una serie de ciclos de dosificación. Un régimen de dosificación de ejemplo consiste en cuatro ciclos de dosificación de una semana de dosis crecientes, comenzando al menos a aproximadamente 10^5 células el día 0, por ejemplo, aumentando gradualmente hasta una dosis objetivo de aproximadamente 10^{10} células en un plazo de varias semanas desde el inicio de un esquema de aumento de dosis intrapaciente. Los modos de administración adecuados incluyen las vías intravenosa, subcutánea, intracavitaria (por ejemplo, mediante dispositivo de acceso a un depósito), intraperitoneal e inyección directa en una masa tumoral.

Una composición farmacéutica de las realizaciones (por ejemplo, que comprende linfocitos T que expresan CAR) puede usarse sola o en combinación con otros agentes bien establecidos útiles para tratar el cáncer. Ya sea administrada de forma individual o en combinación con otros agentes, la composición farmacéutica de las realizaciones puede administrarse a través de varias rutas y en varios sitios en un mamífero, en particular, ser humano, para lograr un efecto concreto. Un experto en la materia reconocerá que, aunque se puede usar más de una ruta para la administración, una ruta concreta puede proporcionar una respuesta más inmediata y más eficaz que otra ruta. Por ejemplo, se puede usar administración intradérmica para el tratamiento del melanoma. La administración local o sistémica se puede lograr mediante la administración que comprende la aplicación o instilación de la formulación en las cavidades corporales, inhalación o insuflación de un aerosol, o mediante introducción parenteral, que comprende administración intramuscular, intravenosa, intraportal, intrahepática, peritoneal, subcutánea o intradérmica.

Se puede proporcionar una composición de las realizaciones en forma de dosificación unitaria en la que cada unidad de dosificación, por ejemplo, una inyección, contiene una cantidad predeterminada de la composición, sola o en combinación apropiada con otros agentes activos. El término forma de dosificación unitaria como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, de modo que cada unidad contiene una cantidad predeterminada de la composición de las realizaciones, sola o en combinación con otros agentes activos, calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado, en asociación con un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, cuando sea apropiado. Las especificaciones para las nuevas formas de dosificación unitaria de las realizaciones dependen de la farmacodinámica concreta asociada con la composición farmacéutica en el sujeto concreto.

Deseablemente, una cantidad efectiva o un número suficiente de los linfocitos T transducidos aislados está presente en la composición y se introduce en el sujeto de manera que, a largo plazo, se establecen respuestas antitumorales específicas para reducir el tamaño de un tumor o eliminar el crecimiento o la reaparición del tumor que, de lo contrario, provocaría la ausencia de dicho tratamiento. Deseablemente, la cantidad de linfocitos T transducidos reintroducidos en el sujeto causa un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 100 % de disminución del tamaño del tumor en comparación con las mismas condiciones cuando los linfocitos T transducidos no están presentes. Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz antitumoral" se refiere a una cantidad eficaz de células inmunoefectoras que expresan CAR para reducir el crecimiento de células cancerosas o tumorales en un sujeto.

Por consiguiente, la cantidad de células inmunoefectoras transducidas (por ejemplo, linfocitos T) administradas debe tener en cuenta la vía de administración y debe ser tal que se introducirá un número suficiente de células inmunoefectoras transducidas para lograr la respuesta terapéutica deseada. Adicionalmente, las cantidades de cada agente activo incluido en las composiciones descritas en el presente documento (por ejemplo, la cantidad por cada célula a contactar o la cantidad por cierto peso corporal) puede variar en diferentes aplicaciones. En general, la concentración de linfocitos T transducidos deseablemente debería ser suficiente para proporcionar al sujeto que está siendo tratado al menos de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^9 linfocitos T transducidos, aún más deseablemente de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 5×10^8 linfocitos T transducidos, aunque se puede usar cualquier cantidad adecuada bien por encima, por ejemplo, mayor de 5×10^8 células, o por debajo, por ejemplo, menos de 1×10^7 células. El programa de dosificación se puede basar en terapias celulares bien establecidas (véase, por ejemplo, Topalian y Rosenberg, 1987; patente de Estados Unidos n.º 4,690,915.) o se puede emplear una estrategia alternativa de infusión continua.

Estos valores proporcionan una guía general del intervalo de linfocitos T transducidos que utilizará el profesional al optimizar el método de las realizaciones. La enumeración en el presente documento de tales intervalos no excluye de ninguna manera la utilización de una cantidad mayor o menor de un componente, como podría estar justificado en una aplicación concreta. Por ejemplo, la dosis real y el programa pueden variar dependiendo de si las composiciones se administran en combinación con otras composiciones farmacéuticas o dependiendo de las diferencias interindividuales en la farmacocinética, la disposición de los fármacos y el metabolismo. Un experto en la técnica puede realizar fácilmente los ajustes necesarios de acuerdo con las exigencias de la situación particular.

VII. Kits de las realizaciones

Cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento puede estar comprendida en un kit. En algunas realizaciones, los linfocitos T-CAR alogénicos se proporcionan en el kit, que también puede incluir reactivos adecuados para expandir las células, tales como medios, CPA, factores de crecimiento, anticuerpos (por ejemplo, para clasificar o caracterizar linfocitos T CAR) y o plásmidos que codifican CAR o transposasa.

En un ejemplo no limitativo, una construcción de expresión del receptor de antígeno quimérico, uno o más reactivos para generar una construcción de expresión del receptor de antígeno quimérico, células para la transfección de la construcción de expresión y o uno o más instrumentos para obtener células alogénicas para la transfección de la construcción de expresión (dicho instrumento puede ser una jeringa, pipeta, fórceps, y o cualquier aparato médicamente aprobado).

En algunas realizaciones, una construcción de expresión para eliminar la expresión endógena de TCR $\alpha \beta$, uno o más reactivos para generar la construcción, y o los linfocitos T CAR⁺ se proporcionan en el kit. En algunas realizaciones, incluye construcciones de expresión que codifican nucleasa(s) de dedo de cinc.

En algunos aspectos, el kit comprende reactivos o aparatos para la electroporación de células.

Los kits pueden comprender una o más composiciones alicuotadas adecuadamente de las realizaciones o reactivos para generar composiciones de las realizaciones. Los componentes de los kits pueden envasarse en medios acuosos o en forma liofilizada. El medio contenedor de los kits puede incluir al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa u otro medio contenedor, en el que se puede colocar un componente y, preferentemente, alicuotado adecuadamente. Cuando hay más de un componente en el kit, el kit también contendrá generalmente un segundo, tercero u otro recipiente adicional en el que los componentes adicionales se pueden colocar por separado. Sin embargo, varias combinaciones de componentes pueden estar comprendidas en un vial. Los kits de las realizaciones también incluirán típicamente un medio para contener la construcción del receptor de antígeno quimérico y cualquier otro recipiente de reactivo de confinamiento estrecho para venta comercial. Dichos recipientes pueden incluir recipientes de plástico moldeados por inyección o por soplado en los que se retienen los viales deseados por ejemplo.

VIII. Ejemplos

Las realizaciones de la invención se describen adicionalmente con detalle por referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos y no están destinados a ser limitantes a menos que se especifique lo contrario. Por tanto, la invención no debe interpretarse de ninguna manera como limitada a los siguientes ejemplos, sino que, debe interpretarse que abarca todas y cada una de las variaciones que se hacen evidentes como resultado de la enseñanza proporcionada en el presente documento.

Ejemplo 1 - Análisis de citometría de flujo

Las PBMC se sometieron a electroporación con ADN que codifica para HER1 -HER3 CAR (que contiene señalización de endodominio CD28 o CD137), La transfección usó el sistema de transposón basado en Sleeping Beauty (descrito anteriormente) para mediar en la integración genómica de las construcciones (véase, por ejemplo, la solicitud internacional (PCT) n.º PCT US14 38005, incorporada en el presente documento por referencia). Las células se propagaron en AaPc irradiadas a una proporción de 1:2 linfocitos T CAR y células presentadoras de antígeno universales (CPAu; K562^{Cneg}-ligando de CAR) (véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional (PCT) n.º PCT US14 39365, incorporada en el presente documento por referencia, que describe las CPAu). Las células CPAu expresan un anticuerpo que se une a la región bisagra de IgG4 común a muchas construcciones CAR y, por lo tanto, pueden estimular el crecimiento de los linfocitos T que expresan CAR sin la necesidad de un antígeno objetivo específico para la construcción de CAR dada. El análisis de citometría de flujo de los linfocitos T CAR resultantes muestra la aparición de linfocitos T CAR⁺ el día 14 de cocultivo con K562 HLAC^{nulo} irradiada que expresa un ligando activador de CAR (Figura 1B).

La cinética de ambos HER1-3 CD28z (que comprende desde el extremo C al extremo scFv-IgG₄-CH₃-CD28-CD3z de unión a HER1/HER3; SEQ ID NO: 10) y HER1-3 CD137z (que comprende desde el extremo N al extremo C scFv-IgG₄-CH₃-CD137-CD3z de unión a HER1/HER3; SEQ ID NO:9) También se evaluó la expansión de linfocitos T-CAR en cultivo en K562^{Cneg} CPAu (CPA universal). Las células T CAR⁺ son señales activadas a través del tallo del CAR

solo en ausencia de coestimulación de linfocitos T. La proliferación de linfocitos T CAR⁺ fue subóptima en ausencia de antígeno y con una estimulación mínima de CPA. Los linfocitos T CAR⁺ HER1-3 CD137z mostraron una mejor proliferación y supervivencia en las CPA universales en comparación con los linfocitos T-CAR que contienen el dominio de señalización CD28 (Figuras 2A-B).

5 **Ejemplo 2 - Detección de heterodímero HER1-3 en células tumorales de cáncer de mama mediante ensayo de ligadura de proximidad *in situ***

10 Para detectar el heterodímero HER1 y HER3, se usaron dos anticuerpos primarios separados contra HER1 y HER3 (Biolegend) junto con sondas y reactivos de ensayo de ligadura de proximidad (PLA) para la reacción de la polimerasa *in situ* (Sigma). Los anticuerpos se valoraron previamente para reducir el ruido de fondo. Con fines de control, las células se trataron con un solo anticuerpo o con sondas de PLA solo de control (anti-conejo+ y anti-ratón-). La detección se basó en la amplificación de señal capturada digitalmente a través del microscopio de fluorescencia (Leica DMI 6000). Las imágenes se analizaron mediante el sistema de imágenes Metamorph™. Los resultados de las células tumorales de cáncer de mama MDA-MB-231 positivas para HER1/HER3 se muestran en las figuras 3A-B, y los resultados para SK-Br3 y MCF7 se muestran en la figura 3C. Las señales de heterodímero HER1-3 se marcan como puntos precisos en la superficie celular. Los resultados muestran que MDA-MB-231 parecía tener la mayor cantidad de heterodímeros HER1 HER3.

20 **Ejemplo 3 - Expresión y funcionalidad de EGFR en una línea tumoral MDA-MB-231 BC de modelo**

25 El EGFR (HER1) de la línea celular MB-231 se eliminó a nivel genómico usando una herramienta de edición del genoma basada en CRISPR-Cas9. Los ARN guiados por oligonucleótidos de cadena superior e inferior (ARNg) específicos para el exón 1 y el exón 9 de los loci del gen EGFR (HER1) se sintetizaron *de novo*. Los pares de oligonucleótidos se hibridaron como molde de ARNg y luego se clonaron en el esqueleto del plásmido (pX459-U6) con secuencias de proteína CRISPR-Cas9. Después de la transformación, los plásmidos se purificaron de células competentes y se verificó la secuencia. El ADN que codifica CRISPR-Cas9 EGFR-E1 o E9 se sometió a electroporación en células MDA-MB-231 mediante un electroporador nucleofector 4D según las instrucciones del fabricante (programa CH-125). Las células EGFR^{KO} se seleccionaron con fármaco de puromicina (1 µg/ml) en cultivo. La expresión se verificó por citometría de flujo usando anticuerpo específico de EGFR (Biolegend) (Figuras 4A-4B).

35 Tres diferentes loci de EGFR (exón 1, 8 y 9) se dirigieron a la desactivación específica de genes de EGFR (HER1) de la línea celular MB-231 usando el sistema CRISPR-Cas9. El ARN guiado dirigido al exón 1 funcionó eficazmente en la eliminación del gen EGFR del MB-231 que anuló la expresión de superficie en un 70 %. Después de 3 semanas de selección en fármaco de puromicina, un porcentaje muy bajo de células retuvo la expresión de EGFR, lo que podría deberse a la aparición de variantes de escape o debido a células que podrían haber desarrollado resistencia a fármacos. Las células EGFR^{KO} MB-231 crecieron más lentamente con el tiempo de duplicación celular reducido a 1/3 de la cinética de crecimiento de la línea celular parental. No se observó ninguna otra anomalía morfológica durante el cultivo. Los resultados demuestran que la línea celular modelo puede ser útil para evaluar la especificidad de EGFR-HER3 CAR.

40 **Ejemplo 4: actividad citolítica de linfocitos T CAR HER1-3 contra células tumorales de mama**

45 La actividad citolítica específica de los linfocitos T CAR HER1-3 contra las células tumorales de mama se mostró en un ensayo de liberación de cromo (CRA) a corto plazo. Los objetivos tumorales se incubaron con ⁵¹Cr según el protocolo estándar para radiomarcas células. Las células objetivo se seleccionaron según el nivel de expresión de EGFR y HER3, la presencia de heterodímeros se confirmó mediante un ensayo de ligadura de proximidad basado en Duolink® (véase el Ejemplo 2 anterior). La especificidad de HER1-3 CAR se determinó mediante la lisis de múltiples líneas celulares de cáncer de mama con evidencia de presencia o falta de heterodímero HER1-HER3. La lisis específica se calculó con una relación diferente de efector-objetivo (E:T). Los gráficos de datos mostraron diferentes niveles de muerte en varios tumores de cáncer de mama que expresan diferentes niveles de heterodímero HER1-3 (Figura 5).

55 Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención.

REFERENCIAS

60 la patente de Estados Unidos n.º 4,690,915;
la patente de Estados Unidos n.º 6,225,042;
la patente de Estados Unidos n.º 6,355,479;
la patente de Estados Unidos n.º 6,362,001;
la patente de Estados Unidos n.º 6,410,319;
la patente de Estados Unidos n.º 6,489,458;
65 la patente de Estados Unidos n.º 6,790,662;
la patente de Estados Unidos n.º 7,109,304;

la patente de Estados Unidos n.º 7,148,203;
 la patente de Estados Unidos n.º 8,227,432;
 la patente de Estados Unidos n.º 8,906,682;
 la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2009/0017000
 5 la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2009/0004142
 la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2011/0117072
 la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2012/0121596
 la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2013/0280285
 la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2014/0274909
 10 Publicación PCT n.º WO2007 103009
 Publicación PCT n.º WO 2014/190273
 Solicitud PCT n.º PCT US2014 039365
 Solicitud PCT n.º PCT US14 39365
 Solicitud PCT n.º PCT US14 38005
 15 Altenschmidt et al., *J. Mol. Med.*, 75:259, 1997.
 Barthel y Goldfeld, *J. Immunol.*, 171:3612-3619, 2003.
 Brentjens et al., *Blood*, 118:4817-4828, 2011.
 Brentjens et al., *Sci. Transl. Med.*, 5:177ra138, 2013.
 Blocker et al., *Adv. Immunol.*, 68:257, 1998.
 20 Cooper y Bollard, *Blood*, 119:2700-2702, 2012.
 Corrigan-Curay et al., *Molecular Therapy*. 22, 1564-1574, 2014.
 Eshhar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, 90:720, 1993.
 Eshhar, *Cancer Immunol. Immunother.*, 45:131, 1997.
 Fitzer-Attas et al., *J. Immunol.*, 160:145, 1998.
 25 Frauwirth et al., *immunity*, 16:769-777, 2002.
 Gross et al., *FASEB J.*, 6:3370, 1992.
 Grupp et al., *New Eng. J. of Med.*, 18:1509-1518, 2013.
 Hekele et al., *Int. J. Cancer*, 68:232, 1996.
 Hwu y col., *Cancer Res.*, 55:3369, 1995.
 30 Ivics et al., *Cell*, 91(4):501-510, 1997.
 Jena et al., *Blood*, 116:1035-1044, 2010.
 Jena et al., *Curr. Hematol Malig. Rep.*, 9:50-56, 2014.
 Kalos et al., *Sci. Transl. Med.*, 3:95ra73, 2011.
 Kim y col., *Nature*, 22(4):403-410, 2004.
 35 Kochenderfer et al., *Blood*, 116:4099-4102, 2010.
 Kochenderfer et al., *Blood*, 119:2709-2720, 2012.
 Krauss et al., *Immunity*, 15:497-502, 2001.
 Marodon et al., *Blood*, 101:3416-3423, 2003.
 Maude et al., *N. Engl. J. Med.*, 371:1507-1517, 2014.
 40 Moritz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, 91:4318, 1994.
 Mates et al., *Nat. Genetics*. 41(6):753-61, 2009.
 Pearce et al., *Science*, 342:210, 2013.
 Porter et al., *N. Engl. J. Med.*, 365:725-733, 2011.
 Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16ª ed., Mack, ed. (1980)
 45 Roberts et al., *Blood*, 84:2878, 1994.
 Rushworth et al., *J. of Immunotherapy*. 37:204-213, 2014.
 Schneider, *J. Embryol. Exp. Morph.*, 27:353-365, 1972.
 Stancovski et al., *J. Immunol.*, 151:6577, 1993.
 Till et al., *Blood*, 112:2261-2271, 2008.
 50 Topalian y Rosenberg, *Acta Haematol.*, 78(Suppl. 1):75-76, 1987.
 van der Windt et al., *Immunity*, 36:68-78, 2012.
 Weijtens et al., *J. Immunol.*, 157:836, 1996.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 55 <110> COOPER, Laurence JENA, Bipulendu
 <120> UN RECEPTOR DE ANTIGENO QUIMÉRICO (CAR) DIRIGIDO A CÉLULAS DE CÁNCER QUE
 EXPRESAN EL HETERODÍMERO HER1-HER3
 60 <130> UTFC.P1250WO
 <150> 62/075,627
 <151> 05/11/2014
 65 <160> 21

ES 2 806 126 T3

<170> Versión PatentIn 3.5

5 <210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 1

Asn Ile Ala Thr Asp Val
1 5

15 <210> 2
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Polipéptido sintético

25 <400> 2

Ser Ala Ser Phe
1

30 <210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 3

Ser Glu Pro Glu Pro Tyr
1 5

40 <210> 4
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 4

ES 2 806 126 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Ala Thr Asp
 20 25 30

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Ile Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu
 85 90 95

Pro Glu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

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

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 5

Leu Ser Gly Asp Trp
 1 5

15 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 6

25 Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp
 1 5 10

30 <210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 7

ES 2 806 126 T3

Glu Ser Arg Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

5 <210> 8
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Gly Asp
 20 25 30

Trp Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ser Arg Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115

15 <210> 9
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 9

ES 2 806 126 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Ala Thr Asp
 20 25 30
 Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Ile Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu
 85 90 95
 Pro Glu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 130 135 140
 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser
 145 150 155 160
 Gly Asp Trp Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 165 170 175
 Glu Trp Val Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala
 180 185 190
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
 195 200 205
 Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 210 215 220
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Arg Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp
 225 230 235 240
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

ES 2 806 126 T3

<210> 10
 <211> 503
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido sintético

 10 <400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Ala Thr Asp
 20 25 30

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Ile Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu
 85 90 95

Pro Glu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 115 120 125

Lys Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 130 135 140

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser
 145 150 155 160

Gly Asp Trp Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 165 170 175

Glu Trp Val Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala
 180 185 190

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn

ES 2 806 126 T3

	195						200									205
Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	
	210					215					220					
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Ser	Arg	Val	Ser	Phe	Glu	Ala	Ala	Met	Asp	
225					230					235					240	
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
				245					250					255		
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
			260					265					270			
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	
		275					280					285				
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
	290					295					300					
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	
305					310					315					320	
Gly	Lys	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	
				325					330					335		
Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	
			340					345					350			
Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	
		355					360					365				
Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	
	370					375					380					
Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	
385					390					395					400	
Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	
				405					410					415		
Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	
			420					425					430			
Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Gln	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	
		435					440					445				

ES 2 806 126 T3

Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
450 455 460

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
465 470 475 480

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
485 490 495

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
500

5 <210> 11
<211> 32
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
1 5 10 15

10 Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn
20 25 30

15 <210> 12
<211> 27
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15

20 Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
20 25

25 <210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 13

ES 2 806 126 T3

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 14
<211> 41
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 14

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

10

<210> 15
<211> 42
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 15

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

20

<210> 16
<211> 230

ES 2 806 126 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

5

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys Met
 225 230

<210> 17
<211> 230
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> IgG4-Fc mutante

10 <400> 17

ES 2 806 126 T3

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15
 Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 20 25 30
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 35 40 45
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 50 55 60
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Lys Met
 225 230

<210> 18
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

ES 2 806 126 T3

<400> 18

Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
20 25 30

Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
35 40

5 <210> 19
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Bisagra sintética

<400> 19

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

15 <210> 20
<211> 18
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador sintético

25 <400> 20

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15

Lys Gly

30 <210> 21
<211> 22
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

35 Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro
20

40

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido del receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a antígeno; un dominio de bisagra; un dominio o dominios transmembrana y uno o más dominios de señalización celular intracelular, donde el dominio de unión a antígeno de dicho CAR comprende (i) un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina que comprende las secuencias de CDR: CDR1 tiene NIATDV, SEQ ID NO: 1; CDR2 tiene SASF, SEQ ID NO: 2; y CDR3 tiene SEPEPY, SEQ ID NO: 3; y (ii) un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende las secuencias de CDR: CDR1 tiene LSGDW, SEQ ID NO: 5; CDR2 tiene EISAAGGYTD, SEQ ID NO: 6; y CDR3 tiene ESRVSFEAAMDY, SEQ ID NO: 7; donde el polipéptido CAR se une selectivamente a un complejo heterodímero HER1 HER3.
2. El polipéptido CAR de la reivindicación 1, donde el dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina es idéntico a la SEQ ID NO: 4.
3. El polipéptido CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina es idéntico a SEQ ID NO:8.
4. El polipéptido CAR de la reivindicación 1, donde el CAR comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO:9 o 10.
5. El polipéptido CAR de la reivindicación 1, donde el CAR comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO:9 o 10.
6. El polipéptido CAR de la reivindicación 1, donde el dominio bisagra comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:18.
7. El polipéptido CAR de la reivindicación 1, donde el dominio transmembrana tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11 o la SEQ ID NO:12.
8. El polipéptido CAR de la reivindicación 1, donde el dominio de señalización celular intracelular comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15.
9. Una célula inmunoefectora transformada que comprende un polipéptido CAR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
10. Una composición farmacéutica que comprende una población de células de acuerdo con la reivindicación 9 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. Un linfocito T de receptor de antígeno quimérico (CAR) que expresa un polipéptido CAR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en el tratamiento del cáncer.
12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz antitumoral de una población de linfocitos T humanos, comprendiendo dichas células un polipéptido CAR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
13. La célula inmunoefectora transformada de la reivindicación 9, donde la célula es un linfocito T, una célula NK, un linfocito T NK o un progenitor de linfocitos T.
14. La célula inmunoefectora transformada de la reivindicación 9, que comprende además una citocina unida a la membrana.
15. La célula inmunoefectora transformada de la reivindicación 14, donde la citocina unida a la membrana es IL-15 unida a la membrana.
16. El linfocito T CAR para el uso de la reivindicación 11, donde el uso es para usar en el tratamiento del cáncer de mama o cáncer de ovario.
17. El linfocito T CAR para el uso de la reivindicación 11, donde el uso es para usar en el tratamiento del melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer gástrico, cáncer colorrectal o cáncer pancreático.
18. El linfocito T CAR para el uso de la reivindicación 11, donde el uso es para el uso en el tratamiento del cáncer que es resistente al trastuzumab o a una terapia con inhibidores de la tirosina quinasa.
19. La célula inmunoefectora transformada de la reivindicación 9, donde la célula inmunoefectora se transforma con un vector viral o no viral que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido CAR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8,

20. La célula inmunoefectora transformada de la reivindicación 19, donde el vector no viral comprende un sistema transposón transposasa de Sleeping Beauty,

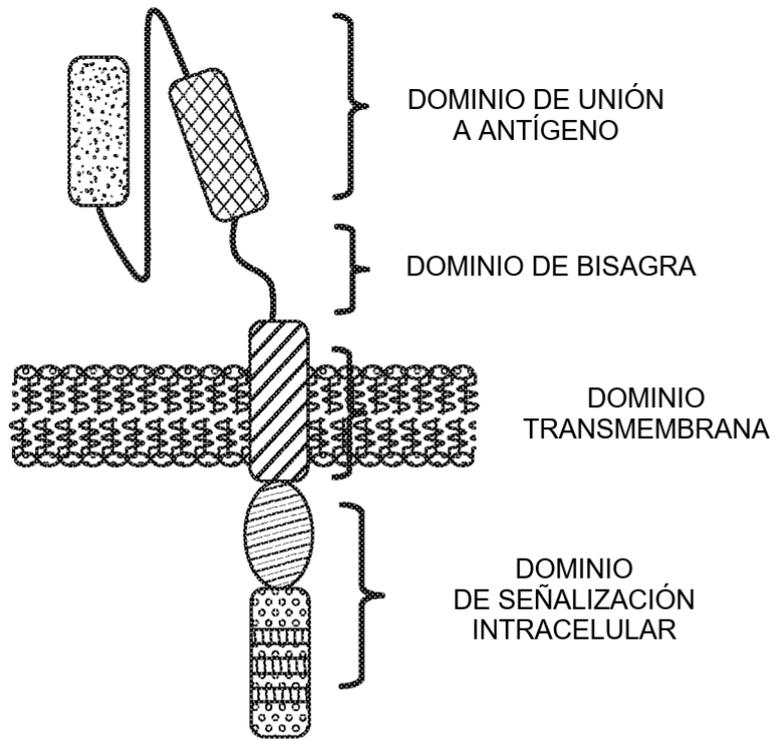


FIG. 1A

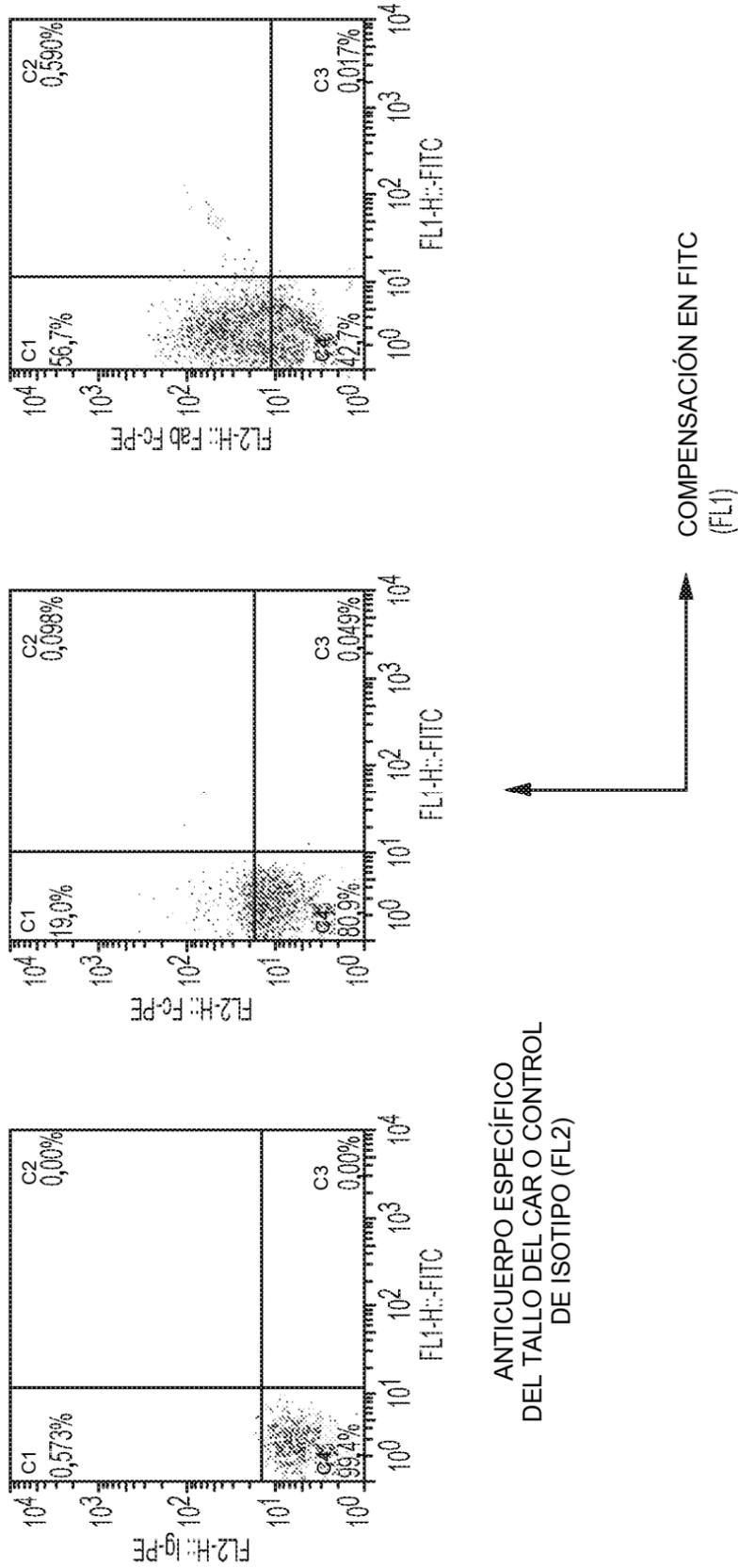
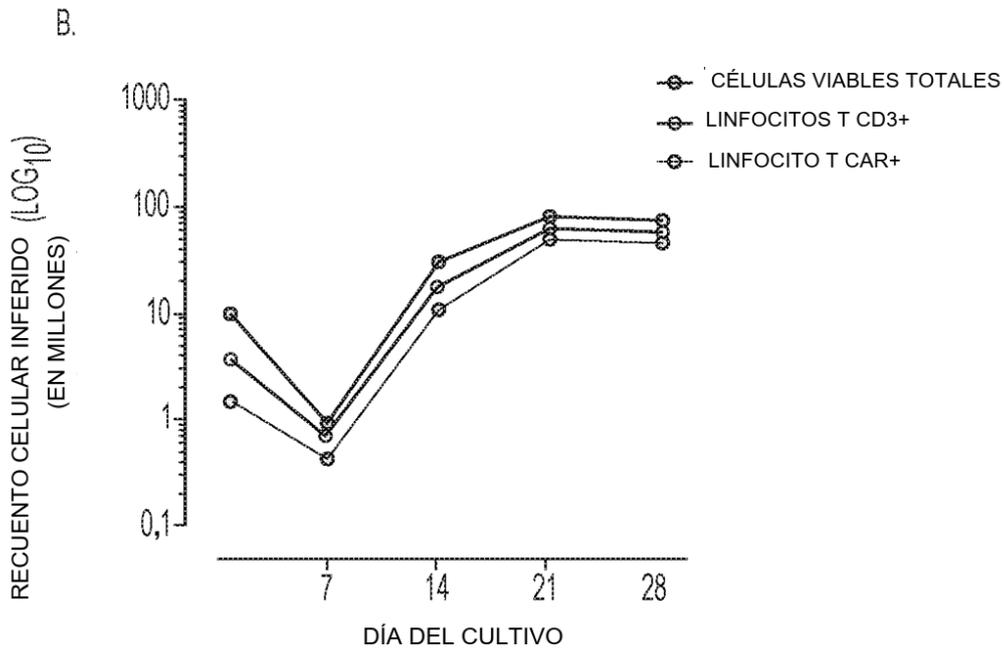
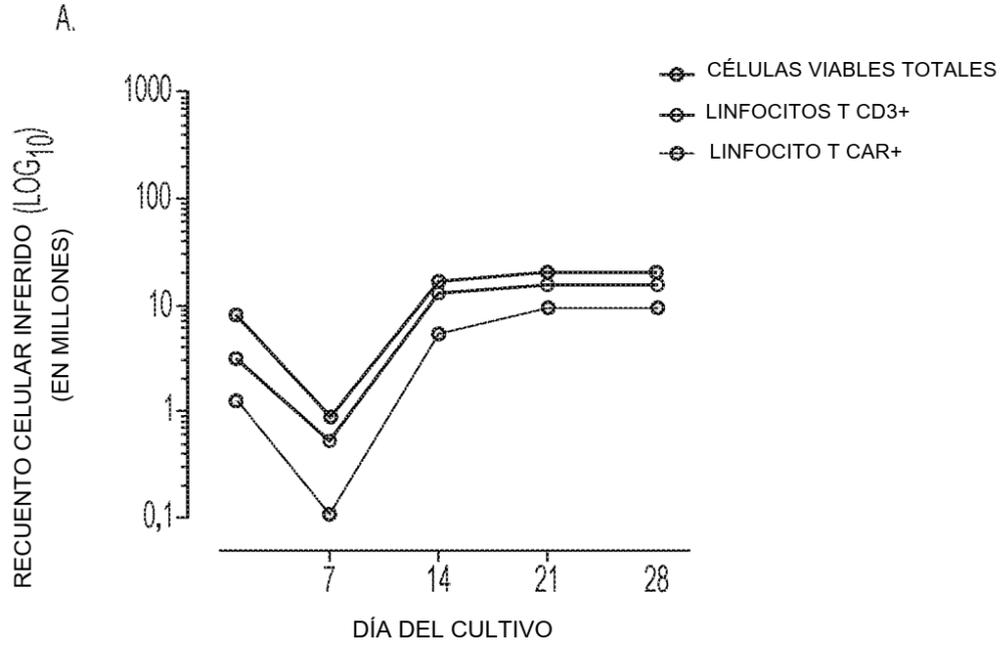


FIG. 1B



FIGS. 2A-B

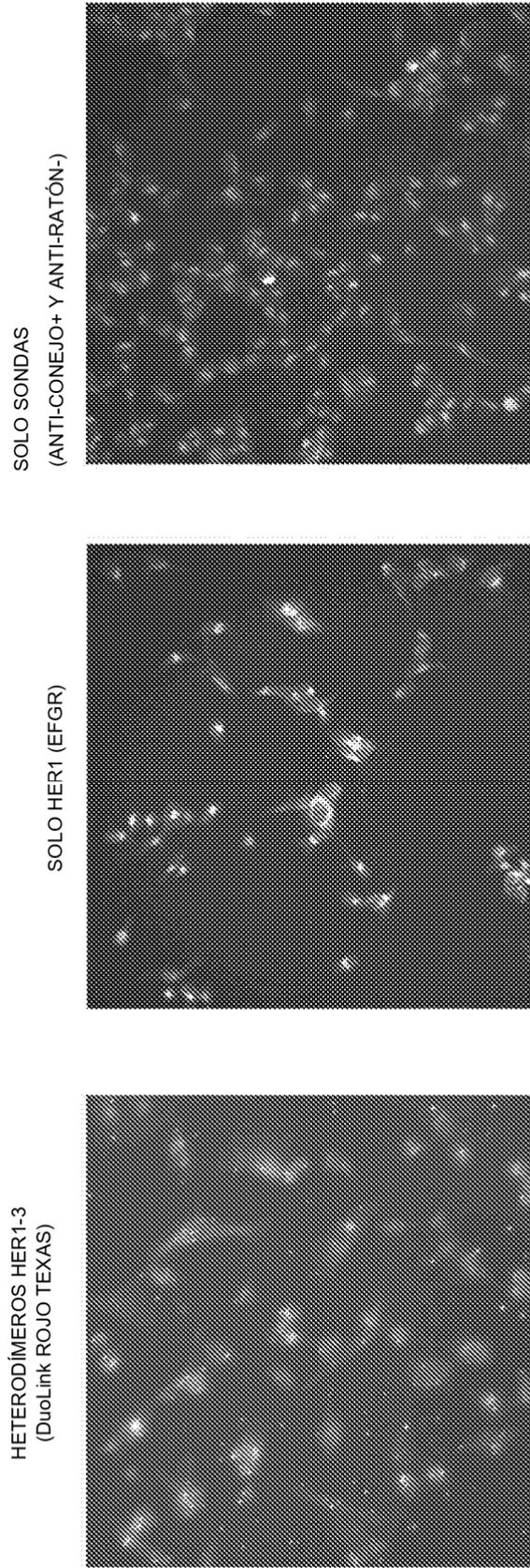
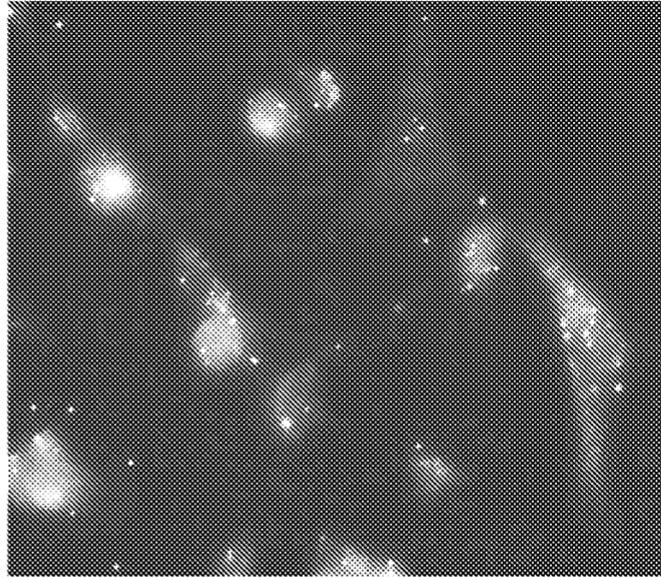


FIG. 3A

MDA-MB-231
(DuoLink)



MDA-MB-231
(CONTROL DE ANTICUERPO)

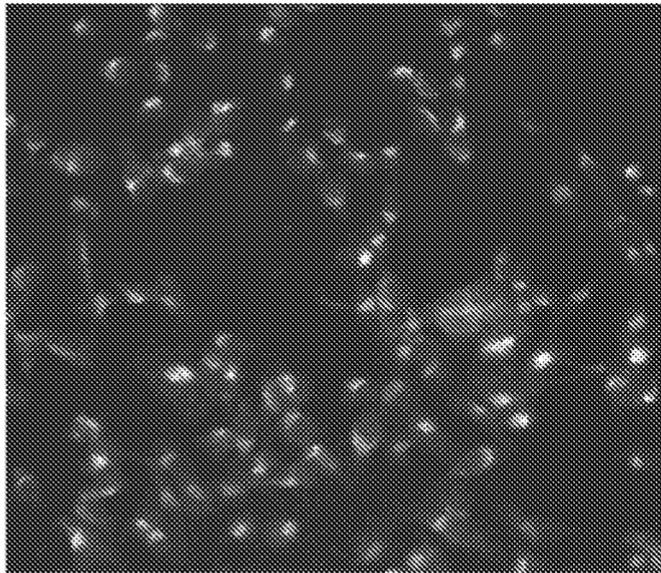


FIG. 3B

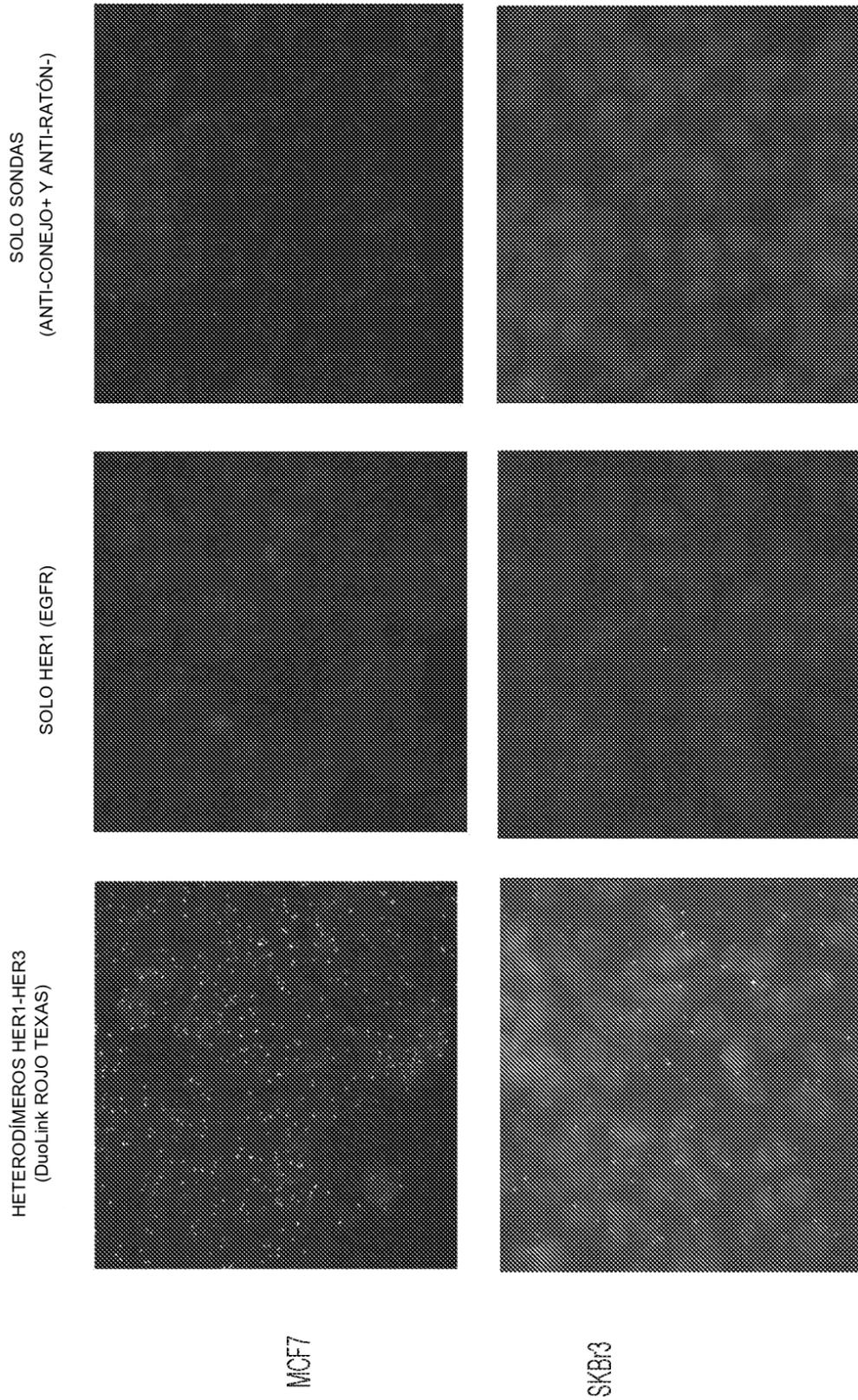
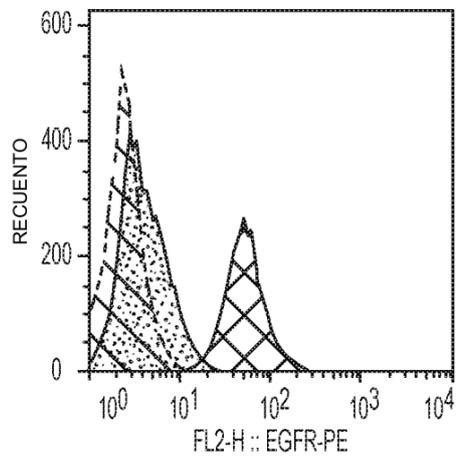
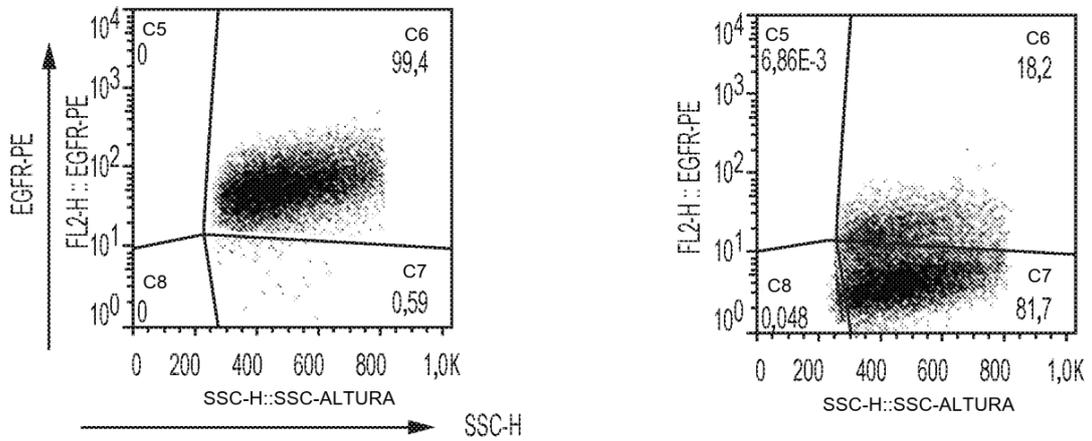


FIG. 3C

A.



B.



FIGS. 4A-4B

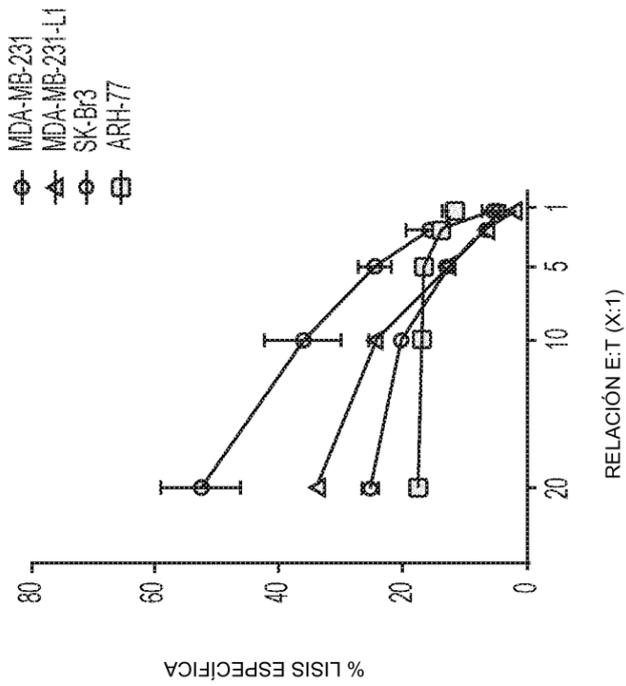
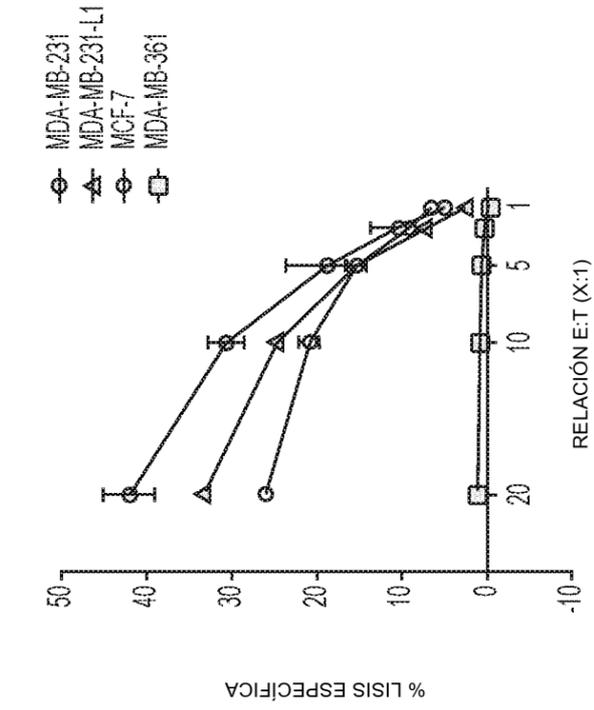


FIG. 5