

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 550**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2016 PCT/US2016/055761**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.04.2017 WO17062628**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2016 E 16787625 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 3359574**

54 Título: **Receptores de antígenos quiméricos dirigidos contra PSCA**

30 Prioridad:

06.10.2015 US 201562238062 P

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

04.03.2021

73 Titular/es:

**CITY OF HOPE (100.0%)
1500 East Duarte Road
Duarte, CA 91010, US**

72 Inventor/es:

**PRICEMAN, SAUL J.;
BROWN, CHRISTINE E. y
FORMAN, STEPHEN J.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 809 550 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 dirigidos contra PSCA

ANTECEDENTES

- 5 El cáncer de próstata (PCa) es el tercer tipo de cáncer más común en los Estados Unidos de América, con alrededor de 200.000 nuevos casos que se diagnosticarán este año. En aproximadamente el 80% de los pacientes con PCa, el fenotipo tumoral incluye la sobreexpresión del antígeno prostático de células madre (PSCA). Además, el PSCA se expresa en casi el 100% de los cánceres de próstata metastásicos óseos, lo que lo convierte en una diana inmunoterapéutica teóricamente atractiva. Los ensayos clínicos recientes con CARs dirigidos contra CD19 para tumores malignos de células B han demostrado resultados impresionantes, pero la replicación de este éxito con otras dianas antigénicas sigue siendo difícil. La inmunoterapia contra tumores sólidos plantea un desafío tumoral más difícil debido a la falta de una expresión de antígeno tan restringida (es decir, CD19 para tumores malignos de células B) y la presencia de un microambiente inmunosupresor que puede dificultar significativamente la eficacia de CARs. Es importante destacar que ha habido casos de toxicidad fuera del tumor dentro de la diana debido a los bajos niveles de expresión del antígeno en tejido normal.
- 10
- 15 Cartillieri M et al. describen, en PLoS One, vol. 9, nº 4, abril 2014, en las páginas 1-12, un procedimiento *ex vivo* de aislamiento y expansión para células T humanas injertadas en receptor de antígeno quimérico.
- Hillerdal V et al. describen, en BMC Cancer, vol. 14, 30, 2014, en las páginas 1-9, que el tratamiento sistémico con células T manipuladas mediante CARs contra PSCA retrasa el crecimiento tumoral subcutáneo y prolonga la supervivencia de los ratones.
- 20 Pulè MA describe, en Molecular Therapy, vol. 12, nº 5, noviembre 2005, en las páginas 933-941, un receptor de antígeno de células T quimérico que aumenta la liberación de citocinas y apoya la expansión clonal de las células T humanas primarias.
- Abate-Daga D et al. describen, en Oncoimmunology, vol. 3, 2014, en las páginas e29194-1 a e29194-3, obstáculos en la ingeniería de inmunoterapias basadas en CARs contra el cáncer de páncreas.
- 25 Abate-Daga D et al. describen en Human Gene Therapy, vol. 25, no. 12, diciembre 2014, en las páginas 1003-1012, un receptor de antígeno quimérico contra el antígeno prostático de células madre que media la destrucción tumoral en un modelo de ratón humanizado de cáncer pancreático. El documento WO 2009/032949 A2 describe anticuerpos de alta afinidad y fragmentos de los mismos que se unen al antígeno de cáncer PSCA.
- 30 El documento WO 2014/031687 A1 describe composiciones que confieren y/o aumentan las respuestas inmunitarias mediadas por la inmunoterapia celular, tal como la transferencia adoptiva de células T de memoria central CD8+ o combinaciones de células T de memoria central con células T CD4+ que se modifican genéticamente para expresar un receptor quimérico.
- El documento WO 2014/144622 A2 describe receptores de antígenos quiméricos que contienen un scFv específico de CD123 que se desarrolló para dirigirlo contra diferentes epítomos en CD123.
- 35 El documento US 2015/0139943 A1 describe receptores quiméricos que comprenden un dominio extracelular con afinidad y específico para la porción Fc de una molécula de inmunoglobulina.
- El documento WO 2015/105522 A1 describe receptores de antígenos quiméricos recombinantes que tienen una unión deteriorada a un receptor Fc.
- 40 Dotti et al. describen, en Immunological Reviews, vol. 257, nº 1, 13 de diciembre de 2013, en las páginas 107-126, el diseño y desarrollo de terapias usando células T que expresan el receptor de antígeno quimérico.
- El documento WO 2012/079000 A1 describe un receptor de antígeno quimérico, en el que el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembránico, una región de señalización coestimuladora, y un dominio de señalización CD3 zeta.
- 45 Jonnalagadda M et al. describen, en Molecular Therapy, vol. 23, nº 4, abril 2015, en las páginas 757-768, que los receptores de antígenos quiméricos con un espaciador de Fc de IgG4 mutado evitan la unión al receptor Fc y mejoran la persistencia de las células T y la eficacia antitumoral.
- Hudecek M et al. describen, en Cancer Immunology Research, vol. 3, nº 2, febrero 2015, en las páginas 125-135, que el dominio espaciador extracelular sin señalización de los receptores de antígenos quiméricos es decisivo para la actividad antitumoral *in vivo*.
- 50 Si bien los componentes básicos necesarios para crear un CAR capaz de unirse a una diana deseada se entienden razonablemente bien, es difícil diseñar un CAR que tenga las cualidades necesarias para uso en una terapia segura

y eficaz. Por ejemplo, es importante evitar una actividad excesiva contra las células no cancerosas que expresan un nivel bajo de la diana, o que no expresan la diana en absoluto. También es importante evitar provocar un alto nivel de producción de citocinas que puede provocar efectos no deseados fuera del tumor. Otros factores que pueden afectar el potencial terapéutico incluyen, pero no se limitan a, la capacidad de replicación y la vida útil de las células T que expresan el CAR y la función efectora general de las células T que expresan el CAR requerida para una respuesta antitumoral sólida.

SUMARIO

La presente invención está definida por las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes representan otras realizaciones de la invención.

Se describen aquí inmunorreceptores quiméricos transmembránicos (receptores de antígenos quiméricos o “CARs”) que comprenden un dominio extracelular, una región transmembránica, y un dominio de señalización intracelular. El dominio extracelular incluye un scFv dirigido contra PSCA. Los CARs descritos aquí son útiles para tratar el cáncer de próstata y las metástasis óseas de cáncer de próstata.

Además de un scFv diana dirigido contra PSCA, el dominio extracelular incluye un espaciador que comprende, por ejemplo, una porción del dominio Fc de IgG4 humano. La porción transmembránica del CAR incluye, por ejemplo, un dominio transmembránico CD4, un dominio transmembránico CD8, un dominio transmembránico CD28, un dominio transmembránico CD3, o un dominio transmembránico 41BB. El dominio de señalización intracelular incluye el dominio de señalización de la cadena zeta del complejo CD3 humano (CD3 ζ) y un dominio coestimulador (por ejemplo, el dominio coestimulador OX40, CD28, CD28gg, o 4-1BB (CD137)). El dominio extracelular permite que el CAR, cuando se expresa en la superficie de una célula T, dirija la actividad de las células T a las células que expresan un PSCA. Estas células incluyen las células de cáncer de próstata. La inclusión de un dominio coestimulador en serie con (pero no necesariamente de forma inmediata adyacente a) CD3 ζ en la región intracelular permite que las células T reciban señales coestimuladoras. Las células T, por ejemplo, las células T autólogas específicas del paciente se pueden manipular para expresar los CARs descritos aquí, y las células manipuladas se pueden expandir y usar en ACT. Se pueden usar diversos subconjuntos de células T. Además, el CAR puede expresarse en otras células inmunitarias tales como las células NK. Cuando un paciente es tratado con una célula inmunitaria que expresa un CAR descrito aquí, la célula puede ser una célula T autóloga o alogénica. En algunos casos, las células usadas son células T de memoria central CD4+ y CD8+ (T_{CM}), que son CD45RA-CD62L+, o células T_{CM/SCM/N} (CD45RA + CD62L +), y el uso de tales células puede mejorar la persistencia a largo plazo de las células después de la transferencia adoptiva en comparación con el uso de otros tipos de células T específicas del paciente. Es importante destacar que el diseño general del CAR evita la actividad no deseada contra las células no cancerosas, incluidas las células no cancerosas que expresan solo un nivel relativamente bajo de PSCA.

El scFv de PSCA puede incluir la secuencia:

DIQLTQSPSTLSASVGDVRTITCSASSSVRFIHWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLSAG
 VPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWGSSPFTFGQGKVEIKGSTSGG
 GSGGGSGGGSSSEVQLVEYGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDYIHWVRQAPG
 KGLEWVAWIDPENGDTEFVPKFQGRATMSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCKTGGFWGQGLTVTVSS (SEQ
 ID NO: 38) o una variante de la misma que tiene hasta 5 sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservativas).

Se describe aquí una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR, que comprende: un scFv dirigido contra PSCA (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) o una variante del mismo que tiene 1-5 (por ejemplo, 1 o 2) modificaciones de aminoácidos; un dominio transmembránico seleccionado de: un dominio transmembránico CD4 o una variante del mismo que tiene 1-10 (por ejemplo, 1 o 2) modificaciones de aminoácidos, un dominio transmembránico CD8 o una variante del mismo que tiene 1-5 (por ejemplo, 1 o 2) modificaciones de aminoácidos, un dominio transmembránico CD28 o una variante del mismo que tiene 1-5 (por ejemplo, 1 o 2) modificaciones de aminoácidos, y un dominio transmembránico CD3 ζ o una variante del mismo que tiene 1-10 (por ejemplo, 1 o 2) modificaciones de aminoácidos; un dominio coestimulador; y un dominio de señalización CD3 ζ de una variante del mismo que tiene 1-5 (por ejemplo, 1 o 2) modificaciones de aminoácidos. Una región espaciadora se encuentra entre el scFv y el dominio transmembránico. La región espaciadora, descrita con mayor detalle a continuación, puede incluir la totalidad o parte de una región Fc humana.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 26, 28, 30, 32, 34 y 36.

También se describe una población de células T humanas transducidas por un vector que comprende un casete de expresión que codifica un receptor de antígeno quimérico, en el que el receptor de antígeno quimérico comprende un scFv dirigido a PSCA que incluye un dominio coestimulador 4-1BB. En diversas realizaciones: la población de células T humanas comprende un vector que expresa un receptor de antígeno quimérico que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 26, 28, 30, 32, 34 y 36; la población de células T humanas

comprende células T de memoria central (T_{CM}) (por ejemplo, al menos 20%, 30%, 40%, 50% 60%, 70%, 80% de las células son células T_{CM}; al menos 15%, 20%, 25%, 30%, 35% de las células T_{CM} son células CD4+, y al menos 15%, 20%, 25%, 30%, 35% de las células T_{CM} son células CD8+).

5 También se describe un método para tratar el cáncer en un paciente, que comprende administrar una población de células T humanas autólogas o alogénicas (por ejemplo, células T autólogas o alogénicas que comprenden células T, por ejemplo al menos 20%, 30%, 40%, 50% 60%, 70%, 80% de las células son células T_{CM}; al menos 15%, 20%, 25%, 30%, 35% de las células T_{CM} son células CD4+; y al menos 15%, 20%, 25%, 30%, 35% de las células T_{CM} son células CD8+) transducidas por un vector que comprende un casete de expresión que codifica un receptor de antígeno quimérico, en el que el receptor de antígeno quimérico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 26-37. En diversas realizaciones: la población de células T humanas comprende células T de memoria central; el cáncer es glioblastoma; y las células T humanas transducidas se prepararon mediante un método que comprende obtener células T del paciente, tratar las células T para aislar células T de memoria central, y transducir al menos una porción de las células de memoria central a un vector viral que comprende un casete de expresión que codifica un receptor de antígeno quimérico, en el que el receptor de antígeno quimérico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 26, 28, 30, 32, 34 y 36.

Como ejemplo, también se describe: una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NOs 26-37; una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 26-37, excepto por la presencia de no más de 5 sustituciones, supresiones o inserciones de aminoácidos; una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 26-37, excepto por la presencia de no más de 5 sustituciones de aminoácidos; y una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 26-37, excepto por la presencia de no más de 2 sustituciones de aminoácidos.

Las células T que expresan un CAR dirigido contra PSCA pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer de próstata, incluyendo el cáncer de próstata refractario a hormonas, y las metástasis de cáncer de próstata, incluyendo las metástasis de hígado y pulmón, así como otros cánceres que expresan una PSCA, que incluyen, pero no se limitan a, pancreático, de vejiga, de colon, y glioblastoma (cerebro primario). De este modo, esta descripción incluye métodos para tratar el cáncer usando células T que expresan un CAR descrito aquí.

Esta descripción también contiene moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de los CARs descritos aquí (por ejemplo, vectores que incluyen una secuencia de ácido nucleico que codifica uno de los CARs) y linfocitos T aislados que expresan cualquiera de los CARs descritos aquí.

35 El CAR descrito aquí puede incluir una región espaciadora ubicada entre el dominio de seleccionador de la diana PSCA (es decir, scFv que reconoce PSCA o una variante del mismo) y el dominio transmembránico. Se puede usar una variedad de espaciadores diferentes. Algunos de ellos incluyen al menos una porción de una región Fc humana, por ejemplo una porción bisagra de una región Fc humana o un dominio CH3 o variantes del mismo. La Tabla 1 a continuación proporciona diversos espaciadores que se pueden usar en los CARs descritos aquí.

40 Tabla 1: Ejemplos de espaciadores

Nombre	Longitud	Secuencia
a3	3 aa	AAA
enlazador	10 aa	GGGSSGGGSG (SEQ ID NO:2)
bisagra IgG4 (S→P) (S228P)	12 aa	ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:3)
bisagra IgG4	12 aa	ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:4)
bisagra IgG4 + enlazador	22 aa	ESKYGPPCPPCPGGGSSGGGSG (SEQ ID NO:5)
bisagra CD28	39 aa	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHL CPSPLFPGPSKP (SEQ ID NO:6)
bisagra CD8-48aa	48 aa	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:7)

ES 2 809 550 T3

Nombre	Longitud	Secuencia
bisagra CD8-45aa	45aa	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR PAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:8)
IgG4(HL-CH3)	129 aa	ESKYGPPCPPCPGGSSGGGSGGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO:9)
IgG4(S228P,L235E,N297Q)	229 aa	ESKYGPPCPPCPAPEFEGGGSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQ STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO:10)
IgG4(CH3)	107 aa	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL LGK (SEQ ID NO:12)

5 Algunas regiones espaciadoras incluyen toda o parte de una región bisagra inmunoglobulínica (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), es decir, la secuencia que se encuentra entre los dominios CH1 y CH2 de una inmunoglobulina, por ejemplo una bisagra Fc de IgG4 o una bisagra CD8. Algunas regiones espaciadoras incluyen un dominio CH3 de inmunoglobulina, o tanto un dominio CH3 como un dominio CH2. Las secuencias derivadas de inmunoglobulina pueden incluir una o más modificaciones de aminoácidos, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, por ejemplo sustituciones que reducen la unión fuera de la diana.

10 Una "modificación de aminoácidos" se refiere a una sustitución, inserción y/o eliminación de aminoácidos en una secuencia de proteína o péptido. Una "sustitución de aminoácidos" o "sustitución" se refiere al reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia peptídica o proteica progenitora por otro aminoácido. Se puede realizar una sustitución para cambiar un aminoácido en la proteína resultante de una manera no conservativa (es decir, cambiando el codón de un aminoácido que pertenece a una agrupación de aminoácidos que tiene un tamaño o característica particular a un aminoácido que pertenece a otra agrupación) o de manera conservativa (es decir, cambiando el codón de un aminoácido que pertenece a una agrupación de aminoácidos que tiene un tamaño o característica particular a un aminoácido que pertenece a la misma agrupación). Tal cambio conservativo
15 generalmente conduce a un cambio menor en la estructura y función de la proteína resultante. Los siguientes son ejemplos de diversas agrupaciones de aminoácidos: 1) Aminoácidos con grupos R no polares: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina; 2) Aminoácidos con grupos R polares sin carga: glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina; 3) Aminoácidos con grupos R polares cargados (cargados negativamente a pH 6,0): ácido aspártico, ácido glutámico; 4) Aminoácidos básicos (cargados positivamente a pH 6,0): lisina, arginina, histidina (a pH 6,0). Otra agrupación puede ser los aminoácidos con grupos fenilo: fenilalanina, triptófano y tirosina.
20

25 En ciertos ejemplos, el espaciador deriva de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 que incluye uno o más restos de aminoácidos sustituidos por un resto de aminoácidos diferente del presente en un espaciador no modificado. El uno o más restos de aminoácidos sustituidos se seleccionan de, pero no se limitan a, uno o más restos de aminoácidos en las posiciones 220, 226, 228, 229, 230, 233, 234, 235, 234, 237, 238, 239, 243, 247, 267, 268, 280, 290, 292, 297, 298, 299, 300, 305, 309, 218, 326, 330, 331, 332, 333, 334, 336, 339, o una combinación de los mismos. En este esquema de numeración, descrito con mayor detalle a continuación, el primer aminoácido en el espaciador IgG4(L235E, N297Q) en la Tabla 1 es 219, y el primer aminoácido en el espaciador IgG4(HL-CH3) en la Tabla 1 es

219, como lo es el primer aminoácido en la secuencia bisagra de IgG y la secuencia del enlazador bisagra (HL) de IgG4 en la Tabla 1

5 En algunos ejemplos, el espaciador modificado deriva de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 que incluye, pero no se limita a, una o más de las siguientes sustituciones de restos de aminoácidos: C220S, C226S, S228P, C229S, P230S, E233P, V234A, L234V, L234F, L234A, L235A, L235E, G236A, G237A, P238S, S239D, F243L, P247I, S267E, H268Q, S280H, K290S, K290E, K290N, R292P, N297A, N297Q, S298A, S298G, S298D, S298V, T299A, Y300L, V305I, V309L, E318A, K326A, K326W, K326E, L328F, A330L, A330S, A331S, P331S, I332E, E333A, E333S, E333S, K334A, A339D, A339Q, P396L, o una combinación de las mismas.

10 En ciertos ejemplos, el espaciador modificado deriva de la región IgG4 que incluye uno o más restos de aminoácidos sustituidos por un resto de aminoácidos diferente del presente en una región no modificada. El uno o más restos de aminoácidos sustituidos se seleccionan de, pero no se limitan a, uno o más restos de aminoácidos en las posiciones 220, 226, 228, 229, 230, 233, 234, 235, 234, 237, 238, 239, 243, 247, 267, 268, 280, 290, 292, 297, 298, 299, 300, 305, 309, 218, 326, 330, 331, 332, 333, 334, 336, 339, o una combinación de los mismos.

15 En algunos ejemplos, el espaciador modificado deriva de una región IgG4 que incluye, pero no se limita a, una o más de las siguientes sustituciones de restos de aminoácidos: 220S, 226S, 228P, 229S, 230S, 233P, 234A, 234V, 234F, 234A, 235A, 235E, 236A, 237A, 238S, 239D, 243L, 247I, 267E, 268Q, 280H, 290S, 290E, 290N, 292P, 297A, 297Q, 298A, 298G, 298D, 298V, 299A, 300L, 305I, 309L, 318A, 326A, 326W, 326E, 328F, 330L, 330S, 331S, 331S, 332E, 333A, 333S, 333S, 334A, 339D, 339Q, 396L, o una combinación de los mismos, en el que el aminoácido en el espaciador no modificado se sustituye por los aminoácidos identificados anteriormente en la posición indicada.

20 Para las posiciones de aminoácidos en inmunoglobulina discutidas aquí, la numeración se realiza según el índice de la EU o el esquema de numeración de la EU (Kabat et al. 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda). El índice de la EU, o el índice de la EU como en Kabat, o el esquema de numeración de la EU se refiere a la numeración del anticuerpo de la EU (Edelman et al. 1969 Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85).

25 Se puede usar una variedad de dominios transmembránicos. La Tabla 2 incluye ejemplos de dominios transmembránicos adecuados. Cuando está presente un dominio espaciador, el dominio transmembránico está ubicado en el terminal carboxilo con respecto al dominio espaciador.

Tabla 2: Ejemplos de dominios transmembránicos

Nombre	Acceso	Longitud	Secuencia
CD3z	J04132.1	21aa	LCYLLDGILFIYGVILTALFL (SEQ ID NO:13)
CD28	NM_006139	27aa	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:14)
CD28(M)	NM_006139	28aa	MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:15)
CD4	M35160	22aa	MALIVLGGVAGLLLFIGLGIFF (SEQ ID NO:16)
CD8tm	NM_001768	21aa	IYIWAPLAGTCGVLLLLSLVIT (SEQ ID NO:17)
CD8tm2	NM_001768	23aa	IYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLY (SEQ ID NO:18)
CD8tm3	NM_001768	24aa	IYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYC (SEQ ID NO:19)
41BB	NM_001561	27aa	IISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVV (SEQ ID NO:20)

30 Muchos de los CARs descritos aquí incluyen uno o más (por ejemplo, dos) dominios coestimuladores. El o los dominios coestimuladores se encuentran entre el dominio transmembránico y el dominio de señalización CD3ζ. La Tabla 3 incluye ejemplos de dominios coestimuladores adecuados junto con la secuencia del dominio de señalización CD3ζ.

Tabla 3: Dominio CD3ζ y ejemplos de dominios coestimuladores

Nombre	Acceso	Longitud	Secuencia
CD3ζ	J04132.1	113 aa	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR (SEQ ID NO:21)
CD28	NM_006139	42aa	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQ PYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 22)
CD28gg*	NM_006139	42aa	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHY QPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:23)
41BB	NM_001561	42 aa	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO:24)
OX40		42 aa	ALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQ EEQADAHSTLAKI (SEQ ID NO:25)

5 Las secuencias de PSCA-CARs usadas en los estudios descritos aquí son las resumidas en la Tabla 4 (inmaduras, que incluyen la secuencia señal GMCSFRa) en las que se indican el dominio espaciador y el o los dominios coestimuladores para cada CAR. Todas estas incluyen el A11 PSCA scFv. El espaciador IgG4(HL-CH3) también se conoce como el espaciador IgG4ΔCH2. Las secuencias maduras (que carecen de la secuencia señal GMCSFRa) para las SEC ID NOs: 26, 27, 28, 29, 30 y 31 son las SEC ID NOs: 32, 33, 43, 35, 36 y 37.

Tabla 4: Ejemplos de CAR dirigido contra PSCA

Nombre	SEQ ID NO con señal/sin señal	FIGURA	Espaciador	TM	Dominio(s) coestimulador(es)
PSCAscFv-IgG4(HL-CH3)-CD4tm-4IBB-zeta	26/32	18	IgG4(HL-CH3) (IgG4ΔCH2)	CD4	4-IBB
PSCAscFv-IgG4(EQ)-CD28tm-CD28gg-zeta	27/33	19	IgG4(EQ)	CD28	CD28gg
PSCAscFv-L-CD4tm-4IBB-zeta	28/34	20	L	CD4	4-IBB
PSCAscFv-IgG4(HL-CH3)-CD28tm-CD28gg-zeta	28/35	21	IgG4(HL-CH3) (IgG4ΔCH2)	CD28	CD28gg
PSCAscFv-IgG4(EQ)-CD4tm-4IBB-zeta	30/36	22	IgG4(EQ)	CD4	4-IBB
PSCAscFv-L-CD28tm-CD28gg-zeta	31/37	23	L	CD28	CD28gg

FIGURA 1: Diagrama esquemático de constructos de CAR con una variedad de regiones espaciadoras (descritas con mayor detalle anteriormente) y que tienen: (un dominio transmembránico CD28 y un dominio coestimulador CD28; o un dominio transmembránico CD4 y un dominio coestimulador 4-1BB. Los constructos usaron un scFv MB1 o un scFv A11. Todos los constructos usaron un dominio citolítico CD3ζ. La secuencia de omisión de T2A separa el CAR de una proteína CD19 truncada (CD19t) que se usa para evaluar la expresión del constructo.

FIGURA 2: Medida de los datos de expresión de tCD19 y scFv (Proteína L) para los diversos constructos en la FIGURA 1.

FIGURA 3A-E: Caracterización *in vitro* de dos células PSCA-CAR T diferentes contra líneas celulares de cáncer de próstata humano. (A) Expresión de PSCA en células tumorales manipuladas para expresar PSCA (LCL, PC-3 y DU145). (B-C) Desgranulación de CD107a y producción de IFNγ en células CAR T después de un cocultivo de 5 h con diana tumoral, medido por citometría de flujo. (D-E) Producción de IFNγ por las células CAR T después de un cultivo de 24 h con proteína PSCA recombinante o dianas tumorales, medida por ELISA.

FIGURA 4A-E: Los PSCA-CARs que contienen un dominio coestimulador 4-1BB demuestran una especificidad superior, proliferación y capacidad de destrucción de células tumorales. Mortalidad tumoral (A) e inducción de PD-1 (B) en células CAR T PSCA(ΔCH2)28z o PSCA(ΔCH2)BBz después de un cocultivo de 72 h con dianas tumorales (DU145, PC-3, DU145-PSCA, y PC-3-PSCA), medidas por citometría de flujo. (C) Mortalidad tumoral con relación Efector:Tumor (E:T) de 0,25:1 - 4:1. (D) Proliferación de CFSE de células CAR T después de un cocultivo de 72 h con dianas tumorales. (E) Cinética de mortalidad tumoral e inducción de PD-1 en células CAR T después de un cocultivo de 1, 2 o 3 días con dianas tumorales (DU145, izquierda; DU145-PSCA, derecha).

FIGURAS 5A-B: El espaciador extracelular dicta la funcionalidad *in vitro* de PSCA-CAR. (A) Desgranulación de CD107a y producción de IFNγ en células CAR T PSCA(EQ)BBz, PSCA(ΔCH2)BBz, y PSCA(L)BBz después de un cocultivo de 5 h con dianas tumorales (DU145 y DU145-PSCA), medidas por citometría de flujo. (B) IFNγ en células CAR T después de un cultivo de 24 h con proteína PSCA recombinante o dianas tumorales, medido por ELISA.

FIGURA 6A-D: Las células PSCA-CAR T demuestran una potente eficacia antitumoral en xenoinjerto de cáncer de próstata y modelos ortotópicos. (A) Se inyectaron por vía subcutánea células PC-3-PSCA (2×10^6) en ratones machos NSG, y cuando los tumores alcanzaron ~30-50 mm³, se inyectaron por vía intratumoral células Tcm CAR (5×10^6), y el crecimiento del tumor se monitorizó mediante medidas con calibrador. (B) Se inyectaron por vía subcutánea células DU145-PSCA (2×10^6) en ratones machos NSG, y se administraron por vía intravenosa células CAR PBMC (5×10^6). (C) Se inyectaron por vía intratibial células PC-3-PSCA (2×10^5) en ratones machos NSG, y se administraron por vía intravenosa células CAR PBMC (2×10^6 o 5×10^6). (D) Persistencia de células CAR T en sangre a los 58 días después de la inyección del tumor en cada grupo.

FIGURA 7A-D: Células PSCA-CAR T que contienen dominios coestimuladores CD28 o 4-1BB. (A) Diagrama del casete de expresión lentiviral con PSCA-CARs que contienen el scFv humanizado (clon A11) dirigido contra PSCA, con un enlazador Fc IgG4 humano modificado con 129 aminoácidos (vacío del dominio CH2, ΔCH2), un dominio transmembránico (ya sea CD28 o CD4), un dominio coestimulador citoplasmático CD28 o 4-1BB, y un dominio citolítico CD3z. Un CD19 truncado sin señalización (CD19t) se separa del CAR con una secuencia de omisión ribosómica T2A para rastrear las células que expresan CAR. (B) Se evaluaron células T de simulación (no transducidas), células CAR T PSCA(ΔCH2)28z, o PSCA(ΔCH2)BBz mediante citometría de flujo para la expresión de CD19t para detectar la transducción lentiviral de CARs (parte superior), o para Proteína L para detectar el scFv (parte superior). (C) Cinética de expansión *ex vivo* para células T de simulación y PSCA-CAR durante 25 días en cultivo. (D) Expresión de la superficie celular de los marcadores indicados de la superficie celular de las células PSCA-CAR T al final de la expansión *ex vivo* según se determina por citometría de flujo. Todos los datos son representativos de al menos dos experimentos independientes.

FIGURA 8A-G: Los PSCA-CARs que contienen un dominio coestimulador 4-1BB muestran una selección tumoral superior en comparación con la coestimulación de CD28 en los PSCA-CARs *in vitro*. (A) Histogramas de expresión de PSCA en líneas celulares de cáncer de próstata humano, determinados por citometría de flujo. Las líneas celulares DU145 y PC-3 se transdujeron lentiviralmente para sobreexpresar PSCA humana bajo el control del promotor EF1α (véase Materiales y métodos). La línea celular PC-3-PGK100p se generó expresando PSCA humana bajo el control del promotor PGK mutante indicado. Las células LAPC-9 expresan endógenamente PSCA humana. (B) Imágenes instantáneas de un ensayo de mortalidad tumoral que compara las células T de simulación, células CAR T PSCA(ΔCH2)28z, o PSCA(ΔCH2)BBz a una relación efector:diana 1:1, evaluado mediante microscopía óptica después de un cocultivo de 3 días con células tumorales PC-3 o PC-3-PSCA. (C) Ensayo de mortalidad tumoral similar al de (B), evaluado por citometría de flujo después de un cocultivo de 3 días con dianas tumorales indicadas. (D) Representaciones gráficas de cebras representativas de la expresión de PD-1 en células PSCA-CAR T después de un cocultivo de 3 días con dianas tumorales indicadas. (E) Cuantificación de la expresión de PD-1 en células T CD8+ CAR+ después de un cocultivo de 3

días con dianas tumorales indicadas. (F) Ensayo de mortalidad tumoral que compara las células PSCA-CAR T a 1, 2 o 3 días de cocultivo con DU145. Expresión de PD-1 en células T en comparación con células T cultivadas sin dianas tumorales. (G) Ensayo de mortalidad tumoral con diferentes relaciones efector:diana, evaluado por citometría de flujo después de un cocultivo de 3 días con PC-3-PSCA o PC-3-PGK100p. Los datos se muestran como $n = 2$ por grupo \pm SD. Todos los datos son representativos de al menos dos experimentos independientes.

FIGURA 9A-F: Los PSCA-BB ζ CARs muestran producción de citocinas dependiente de antígenos in vitro. (A) Producción de IFN γ cuantificada por ELISA en sobrenadantes de células PSCA-CAR T cultivadas durante la noche con células tumorales DU145 o DU145-PSCA. (B) Igual que en (A) de células PSCA-CAR T cultivadas durante la noche con células tumorales PC-3, PC-3-PGK100p, o PC-3-PSCA. (C) Producción de IFN γ cuantificada por ELISA en sobrenadantes de células PSCA-CAR T cultivadas durante la noche en PSCA humano recombinante unido a placa a concentraciones de proteína variables. (D) Gráficas de cebra representativas que muestran la desgranulación de CD107a por las células PSCA-CAR T después de un cocultivo de 4 a 6 horas con dianas tumorales indicadas. (E) Cuantificación de la desgranulación de CD107a por las células PSCA-CAR T de (D). (F) Gráficas de cebra representativas de la expresión de CD137 en células T de simulación, células CAR T PSCA(Δ CH2)28 ζ , o PSCA(Δ CH2)BB ζ después de un cocultivo de 3 días con dianas tumorales indicadas. Los datos se muestran como $n = 2$ por grupo \pm SD. Todos los datos son representativos de al menos dos experimentos independientes.

FIGURA 10A-F: Eficacia terapéutica sólida de las células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ en modelos de xenoinjerto humano metastásico de hueso subcutáneo y ortotópico de cáncer de próstata. (A) Volumen tumoral (mm³) en ratones NSG con tumores PC-3-PSCA subcutáneos ($2,5 \times 10^6$) el día 0, tratados con células T de simulación o CAR PSCA(Δ CH2)BB ζ a las dosis indicadas mediante inyección intratumoral (i.t.) el día 34. $N = 4$ ratones por grupo. Los datos son representativos de al menos dos experimentos independientes. (B) Ratones con tumores grandes (aprox. 500 mm³) tratados con 5×10^6 células T de simulación o células CAR T por inyección i.v. en el día 51. $N = 3$ ratones por grupo. Los datos son representativos de al menos dos experimentos independientes. (C) Inmunohistoquímica de tumores PC-3-PSCA cosechados 11 días después del tratamiento i.v. con células T teñidos con CD3 humano (paneles superiores) y Granzyme B (paneles inferiores). (D) Ratones con tumores intratibiales, con células PC-3 (tipo salvaje) ($0,2 \times 10^6$) en la pata trasera derecha, y células PC-3-PSCA ($0,2 \times 10^6$) en la pata trasera izquierda. El día 14, los ratones se trataron mediante inyección i.v. con 5×10^6 células T de simulación o células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ positivas para luciferasa de luciérnaga ($\sim 30\%$). El tráfico de células T se monitorizó a las 4 horas, 1 día, 2 días y 4 días mediante imágenes ópticas no invasivas (Xenogen). Cuantificación de imágenes de flujo, que muestra la relación de PC-3-PSCA/PC-3 (tipo salvaje). $N = 4 - 6$ ratones por grupo. (e) Ratones NSG con PC-3-PSCA-eGFP-ffluc intratibial (pata trasera izquierda) ($0,2 \times 10^6$). Las cinéticas del crecimiento tumoral se monitorizaron mediante imágenes ópticas no invasivas (Xenogen). El día 14, los ratones se inyectaron i.v. con 5×10^6 células T de simulación o dosis variables de células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ . Se muestran imágenes de flujo representativas de ratones el día 13 (pretratamiento) y el día 33. (F) Cuantificación de imágenes de flujo (con región de interés (ROI) en el sitio de inyección del tumor) de tumor solamente, de células T de simulación (5×10^6) y de grupos de células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ (5×10^6 , $2,5 \times 10^6$, 1×10^6 , $0,5 \times 10^6$). $N = 4$ ratones por grupo para grupos CAR. Los datos son representativos de al menos dos experimentos independientes.

FIGURA 11A-D: Eficacia antitumoral duradera de las células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ en comparación con las células CAR T PSCA(Δ CH2)28 ζ en un modelo de xenoinjerto metastásico óseo derivado de un paciente con cáncer de próstata. (A) Ratones NSG con LAPC-9-eGFP-ffluc intratibial (pata trasera izquierda) ($0,15 \times 10^6$). Las cinéticas del crecimiento tumoral se monitorizaron mediante imágenes ópticas no invasivas (Xenogen). El día 14, los ratones se inyectaron i.v. con 5×10^6 de células T de simulación, células CAR T PSCA(Δ CH2)28 ζ o PSCA(Δ CH2)BB ζ . Se muestran imágenes de flujo representativas de ratones en los días indicados. (B) Cuantificación de imágenes de flujo, con ROI en la tibia (paneles superiores) o de cuerpo completo (paneles inferiores) de cada grupo de tratamiento. (C) Niveles de PSA determinados por ELISA a partir de suero extraído de ratones tratados ($n = 2 - 3$ por grupo) en el día 76 después de la inyección del tumor. (D) Análisis de citometría de flujo de sangre periférica de ratones 24 y 76 días después de la inyección del tumor ($n = 2 - 3$ por grupo). Los datos se compilan a partir de dos experimentos in vivo independientes.

FIGURA 12: Fenotipos de la superficie celular de poblaciones de PBMC y T_{CM}. (a) Las poblaciones iniciales de PBMC y TCM se analizaron por citometría de flujo para la expresión de CD4, CD8, CD45RA, CD62L, CCR7, CD14, CD25 y CD95. Se muestran gráficas representativas de FACS.

FIGURA 13: Análisis de expresión de ARNm de PSCA en líneas celulares tumorales. (a) qPCR se realizó en diversas líneas celulares de cáncer de próstata y no de próstata para cuantificar la expresión de PSCA. El ARNm de PSCA se normalizó a ARNm de GAPDH.

FIGURA 14A-C: Comparación de PSCA-CARs que contienen scFv de MB1 y que contienen scFv de A11. (A) Diagrama del casete de expresión lentiviral con PSCA-CARs que contienen el scFv de MB1 o de A11

humanizado que se dirige contra PSCA, con un enlazador Fc IgG4 humano modificado con 129 aminoácidos (vacío del dominio CH2, Δ CH2), un dominio transmembránico CD4, un dominio coestimulador citoplasmático 4-1BB, y un dominio citolítico CD3 ζ . Un CD19 truncado sin señalización (CD19t) se separa del CAR con una secuencia de omisión ribosómica T2A para rastrear las células que expresan CAR. (B) Células T de simulación (no transducidas), células CAR T PSCA-MB1-(Δ CH2)BB ζ , o PSCA-A11-(Δ CH2)BB ζ que expresan CD19 para detectar la transducción lentiviral de CARs (parte superior) o Proteína L para detectar el scFv (parte inferior) según lo determinado por citometría de flujo. (C) Ensayo de mortalidad tumoral evaluado por citometría de flujo después de un cocultivo de 3 días con dianas tumorales indicadas.

FIGURA 15: Producción de citocinas por las células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ transducidas en PBMC o TCM. Producción de IFN γ cuantificada por ELISA en sobrenadantes de células PSCA-CAR T cultivadas en PSCA humano recombinante unido a placa a concentraciones de proteína variables.

FIGURA 16: Activación y fenotipo exhaustivo de células T de simulación, células CAR T PSCA(Δ CH2)28 ζ , y PSCA(Δ CH2)BB ζ contra OKT3 unido a la placa. Expresión de CD137 y PD1 por citometría de flujo en células T después de 2 días de incubación con OKT3 unido a placa (10 μ g/ml).

FIGURA 17A-D: Tratamiento de recurrencias tumorales negativas para PSCA con células CAR T específicas de HER2. (A) Cinética de recurrencias tumorales en ratones con tumor PC-3-PSCA tratados con PSCA(Δ CH2)BB ζ . Cada línea representa un ratón individual por grupo. N = 4 por grupo. Los datos son representativos de al menos dos estudios independientes. (B) Inmunohistoquímica de tumores PC-3-PSCA extraídos de tumores tratados con células T de simulación (en el punto final primario) o tumores recurrentes tratados con PSCA(Δ CH2)BB ζ teñidos con PSCA humano, CD3 y HER2. (C) Expresión de HER2 en células tumorales PC-3-PSCA, evaluada por citometría de flujo. (D) Volumen tumoral (mm^3) en ratones con tumores PC-3-PSCA tratados i.v. con 5×10^6 células T de simulación o células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ (N = 6 por grupo) el día 24 ("1^{er} tx"). En el día 81, cuando los ratones tratados con células CAR T mostraron recurrencia tumoral (50 - 100 mm^3), los ratones se asignaron a un segundo tratamiento ("2^o tx"), recibiendo inyecciones i.t. de 5×10^6 células T de simulación, células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ , o células CAR T HER2 (N = 2 por grupo).

FIGURA 18: Secuencia de aminoácidos de PSCAscFv-IgG4(HL-CH3)-CD4tm-4IBB-zeta (SEQ ID NO:26).

FIGURA 19: Secuencia de aminoácidos de PSCAscFv-IgG4(EQ)-CD28tm-CD28gg-zeta (SEQ ID NO:27).

FIGURA 20: Secuencia de aminoácidos de PSCAscFv-L-CD4tm-4IBB-zeta (SEQ ID NO:28).

FIGURA 21: Secuencia de aminoácidos de PSCAscFv-IgG4(HL-CH3)-CD28tm-CD28gg-zeta (SEQ ID NO:29).

FIGURA 22: Secuencia de aminoácidos de PSCAscFv-IgG4(EQ)-CD4tm-4IBB-zeta (SEQ ID NO:30).

FIGURA 23: Secuencia de aminoácidos de PSCAscFv-L-CD28tm-4IBB-zeta (SEQ ID NO:31).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A continuación se describe la estructura, construcción y caracterización de diversos receptores de antígeno quimérico dirigidos contra PSCA. Un antígeno quimérico (CAR) es una biomolécula recombinante que contiene, como mínimo, un dominio de reconocimiento extracelular, una región transmembránica, y un dominio de señalización intracelular. El término "antígeno", por lo tanto, no se limita a las moléculas que se unen a los anticuerpos, sino a cualquier molécula que pueda unirse específicamente a una diana. Por ejemplo, un CAR puede incluir un ligando que se une específicamente a un receptor de superficie celular. El dominio de reconocimiento extracelular (también denominado dominio extracelular o simplemente por el elemento de reconocimiento que contiene) comprende un elemento de reconocimiento que se une específicamente a una molécula presente en la superficie celular de una célula diana. La región transmembránica ancla el CAR en la membrana. El dominio de señalización intracelular comprende el dominio de señalización de la cadena zeta del complejo CD3 humano, y opcionalmente comprende uno o más dominios de señalización coestimuladores. Los CARs pueden tanto unir el antígeno como transducir la activación de células T, independientemente de la restricción de MHC. De este modo, los CARs son inmunorreceptores "universales" que pueden tratar a una población de pacientes con tumores positivos a antígenos, independientemente de su genotipo HLA. La inmunoterapia adoptiva con linfocitos T que expresan un CAR específico de tumor puede ser una estrategia terapéutica poderosa para el tratamiento del cáncer.

Generamos y ensayamos una amplia variedad de PSCA CAR en diversos ensayos para identificar un CAR que tenga la actividad y especificidad apropiadas sin generar una producción excesiva de citocinas.

En algunos casos, el CAR descrito aquí puede producirse usando un vector en el que el marco de lectura abierto de CAR está seguido por una secuencia de omisión de ribosoma T2A y un CD19 truncado (CD19t), que carece de la cola de señalización citoplasmática (truncada en el aminoácido 323). En esta disposición, la coexpresión de CD19t proporciona un marcador de superficie inerte no inmunogénico que permite la medida precisa de las células

modificadas genéticamente, y permite la selección positiva de células modificadas genéticamente, así como el rastreo eficiente de las células y/o formación de imágenes de las células T terapéuticas in vivo después de la transferencia adoptiva. La coexpresión de CD19t proporciona un marcador para el direccionamiento inmunológico de las células transducidas in vivo usando anticuerpos y/o reactivos de inmunotoxina clínicamente disponibles para eliminar selectivamente las células terapéuticas, y de ese modo funcionar como un interruptor suicida.

El CAR descrito aquí puede producirse por cualquier medio conocido en la técnica, aunque preferiblemente se produce usando técnicas de ADN recombinante. Los ácidos nucleicos que codifican las varias regiones del receptor quimérico se pueden preparar y ensamblar en una secuencia codificante completa mediante técnicas estándar de clonación molecular conocidas en la técnica (cribado de biblioteca genómica, PCR, ligación asistida por cebador, mutagénesis dirigida al sitio, etc.) como sea conveniente. La región codificante resultante se inserta preferiblemente en un vector de expresión y se usa para transformar una línea celular hospedante de expresión adecuada, preferiblemente una línea celular de linfocitos T, y lo más preferible una línea celular de linfocitos T autólogos.

Diversos subconjuntos de células T aislados del paciente, incluyendo subconjuntos de PBMC no seleccionadas o células T CD3 enriquecidas o células T de memoria enriquecidas, pueden transducirse con un vector para la expresión de CAR. Las células T de memoria central son un subconjunto de células T útil. Las células T de memoria central pueden aislarse de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) seleccionando las células CD45RO+/CD62L+, usando, por ejemplo, el dispositivo CliniMACS®, para seleccionar inmunomagnéticamente las células que expresan los receptores deseados. Las células enriquecidas para las células T de memoria central pueden activarse con anti-CD3/CD28, transducidas con, por ejemplo, un vector lentiviral SIN que dirige la expresión del CAR, así como un CD19 humano truncado (CD19t), un marcador de superficie no inmunogénico tanto para la detección in vivo como para la selección ex vivo potencial. Las células T de memoria central activadas/modificadas genéticamente pueden expandirse in vitro con IL-2/IL-15 y después criopreservarse.

Ejemplo 1: Construcción de CAR dirigido contra PSCA

La FIGURA 1 representa esquemáticamente los elementos en el marco de lectura abierto del vector de expresión usado para expresar los diversos CARs (panel superior) y el CAR resultante (panel inferior). El CAR usó el scFv de MB1 dirigido contra PSCA. El scFv de A11 no se usó, pero es una alternativa adecuada. Se usaron tres espaciadores diferentes: IgG4(EQ), que incluye una región Fc de IgG4, que incluye regiones CH3, CH4 y bisagra, y tiene dos sustituciones de aminoácidos que reducen la unión a los receptores Fc nativos; IgG4(HL-CH3), que es similar a IgG4(EQ), pero carece del dominio CH2, y tiene una secuencia enlazadora corta ubicada entre la región bisagra y la región CH3; y L, que es una secuencia enlazadora corta. Los tres espaciadores se describen en detalle en la Tabla 1. Se usaron dos dominios transmembránicos alternativos: CD4 y CD28, ambos descritos con mayor detalle en la Tabla 2. Se usaron dos dominios de coestimulación alternativos: CD28gg, una variante del dominio coestimulador CD28, y 4-1BB. Ambos se describen en detalle en la Tabla 3. Todos los CARs incluyeron el dominio de señalización citoplasmático CD3ζ, también descrito en la Tabla 3. Las secuencias codificantes de CAR fueron seguidas por la secuencia de omisión ribosómica T2A y una secuencia CD17 truncada para permitir la coexpresión, como marcador, de CD19 truncado de superficie, incompetente para la señalización.

Las células T de memoria central masivas que incluían células CD4+ y células CD8+ se transdujeron con lentivirus que expresa uno de los seis CARs diferentes representados en la Tabla 4. De este modo, el CAR incluía un dominio coestimulador 4-1BB (y un dominio transmembránico CD4) o un dominio coestimulador CD28gg (y un dominio transmembránico CD28) y uno de los tres dominios espaciadores diferentes: IgG4(EQ), IgG4(HL-CH3) o L (representados como EQ, ΔCH2 o L en la FIGURA 2). Se realizó FACS para medir las células T que expresan CD19 (CD19t), para la detección de CAR, y proteína L, para la detección de scFv, para determinar la estabilidad. Los resultados de este análisis se representan en la FIGURA 2.

Ejemplo 2: Células tumorales de próstata que expresan PSCA

Dos líneas diferentes de células tumorales de cáncer de próstata, PC-3 y DU145, se manipularon para expresar PSCA. La FIGURA 3A proporciona datos de expresión de PSCA para las células progenitoras y las células manipuladas, así como las células LCL.

Ejemplo 3: Producción de IFN-γ por diversas células T dirigidas contra PSCA

Las FIGURAS 3B-E proporcionan datos de producción de IFNγ y datos de desgranulación de CD107a para los dos CARs diferentes después de un cocultivo de 5 h con diana tumoral (células DU145, células PC3, células DU145 transfectadas con un vector de expresión de PSCA, o células PC3 transfectadas con un vector de expresión de PSCA), según se midió por citometría de flujo. Las FIGURAS 4D-E proporcionan datos para la producción de IFNγ por las células CAR T después de un cultivo de 24 h con proteína PSCA recombinante o dianas tumorales, medida por ELISA. Aquí, también se puede observar que el CAR con un dominio coestimulador 4-1BB produce menos IFNγ y niveles más bajos de marcador de desgranulación que CAR con un dominio coestimulador CD28.

Esta evaluación de la desgranulación y la producción intracelular de IFN- γ reveló que todos los CARs que incluyen un dominio coestimulador CD22gg exhiben actividad no específica contra las células DU145 de tipo salvaje y las células PC3 de tipo salvaje, mientras que los CARs que incluyen un dominio coestimulador 4-IBB exhiben mucha menos actividad no específica. Además, los CARs que incluyen un dominio coestimulador CD22gg producen más citocinas en general que los CARs que incluyen un dominio coestimulador 4-IBB.

Ejemplo 4: Mortalidad celular por diversos CARs

Una comparación de un CAR que tiene un dominio coestimulador CD28 y un CAR que tiene un dominio coestimulador 4-IBB (descrito en la FIGURA 3A) demostró que los PSCA-CARs que contienen un dominio coestimulador 4-1BB demuestran una especificidad, una proliferación, y una capacidad de mortalidad de células tumorales superiores. Los resultados de este análisis se muestran en la FIGURA 4A-E. La mortalidad tumoral fue más específica para CAR que tenía un dominio coestimulador 4-IBB que un dominio coestimulador CD28, como se muestra por la menor mortalidad de células no transfectadas con un constructo de expresión de PSCA (FIGURA 4A). El CAR que tiene un 4-IBB también exhibió niveles más bajos de inducción de PD-1 (FIGURA 4B). La mortalidad y la inducción de PD-1 se midieron después de un cocultivo de 72 h con dianas tumorales (DU145, PC-3, DU145-PSCA, y PC-3-PSCA). La FIGURA 4C muestra los resultados de un análisis de mortalidad tumoral con relaciones Efecto:Tumor (E:T) de 0,25:1 - 4:1. La FIGURA 4D representa los resultados de un análisis de proliferación de células CAR T después de un cocultivo de 72 h con dianas tumorales, y la FIGURA 4E muestra la cinética de la mortalidad tumoral y la inducción de PD-1 en células CAR T después de un cocultivo de 1, 2 o 3 días con dianas tumorales (DU145, izquierda; DU145-PSCA, derecha).

Ejemplo 5: Impacto del espaciador en la de función CAR

Los estudios representados en la FIGURA 5A-B muestran que la región espaciadora puede afectar la expresión de CD107a (desgranulación) y la producción de IFN- γ . El CAR aquí incluye un dominio transmembránico CD4 y un dominio coestimulador 4-IBB.

Ejemplo 6: Eficiencia antitumoral en xenoinjerto de cáncer de próstata y modelos ortotópicos

Dos células PSCA-CAR T descritas anteriormente demuestran una potente eficacia antitumoral en xenoinjerto de cáncer de próstata y modelos ortotópicos. Las células PC-3-PSCA (2×10^6) se inyectaron por vía subcutánea en ratones machos NSG, y cuando los tumores alcanzaron $\sim 30-50 \text{ mm}^3$, se inyectaron por vía intratumoral células Tcm CAR (5×10^6), y el crecimiento tumoral se monitorizó mediante medidas con calibrador (FIGURA 6A). Se inyectaron por vía subcutánea células DU145-PSCA (2×10^6) en ratones machos NSG, y se administraron por vía intravenosa células PBMC CAR (5×10^6) (FIGURA 6B). Para crear un modelo ortotópico, se inyectaron intratibialmente células PC-3-PSCA (2×10^5) en ratones machos NSG, y se administraron por vía intravenosa células PBMC CAR (2×10^6 o 5×10^6) (FIGURA 6C). Se evaluó la persistencia de células CAR T en sangre a los 58 días después de la inyección del tumor en cada grupo del Panel B (FIGURA 6D).

Ejemplo 7: CAR dirigido contra PSCA que contiene un dominio 4-1BB muestra selectividad superior y reduce el agotamiento de células T en comparación con un dominio CD28

Se compararon (FIGURA 7A) dos constructos PSCA-CAR que incluyen el scFv de PSCA humanizado derivado de 1G8 (Clon A11) [Lepin et al. 2010 Eur J Nucl Med Mol Imaging 37:529], el espaciador extracelular ΔCH2 , el dominio citotóxico CD3 ζ , y el rastreador de células CD19t, y que difieren solamente en su dominio coestimulador (4-1BB frente a CD28). Este Ejemplo y los Ejemplos 8-11 describen estudios que usan los PSCA-CARs manipulados en células T derivadas de PBMC, a menos que se indique lo contrario. Por ejemplo, las células T de memoria central (T_{CM}), que tienen un fenotipo inicial diferente de células T de superficie celular, se usaron en algunos estudios (FIGURA 12).

Ambos PSCA-CARs se expresaron de manera estable (FIGURA 7B), según lo determinado por la detección citométrica de flujo de scFv y CD19t, aunque a niveles más bajos para PSCA(ΔCH2)BB ζ en comparación con PSCA(ΔCH2)28 ζ . Estas células CAR T mostraron una cinética de expansión de células T ex vivo comparable (FIGURA 7C) y fenotipos similares de células T de superficie celular (FIGURA 7D).

A continuación, varias líneas celulares de cáncer de próstata humano que se manipularon de manera estable para expresar el gen PSCA humano bajo el control del promotor EF1 α capacidades de mortalidad tumoral de las células CAR T PSCA(ΔCH2)28 ζ y PSCA(ΔCH2)BB ζ (FIGURA 8A). Las células tumorales PC-3 también fueron manipuladas con PSCA conducido por un promotor PGK mutante (Frigault et al. 2015 Cancer Immunol Res 3:356) para obtener una línea celular de baja densidad antigénica (denominada PGK100p). LAPC-9 es un xenoinjerto de tumor primario derivado de un paciente con cáncer de próstata metastásico óseo (Craft et al. 1999 Cancer Res 59:503) que expresa PSCA de forma endógena. Las células CAR T PSCA(ΔCH2)28 ζ o PSCA(ΔCH2)BB ζ se cultivaron conjuntamente con diversas dianas tumorales. Las imágenes de células demostraron cualitativamente que ambas CARs eliminaron con cinéticas similares (FIGURA 8B). En un ensayo de mortalidad tumoral por separado, se usó citometría de flujo para cuantificar la mortalidad tumoral por las células CAR T PSCA(ΔCH2)28 ζ y PSCA(ΔCH2)BB ζ . Mientras que las células CAR T PSCA(ΔCH2)28 ζ y PSCA(ΔCH2)BB ζ eliminaron a las células tumorales que expresan PSCA con una

eficacia similar, PSCA(Δ CH2)28 ζ mostró una elección por las células tumorales DU145 y PC-3 de tipo salvaje que no expresan PSCA (FIGURA 8C). Se realizó un análisis de PCR en tiempo real cuantitativa de la expresión de PSCA en todas las dianas tumorales, y demostró que si bien la expresión de la proteína PSCA era indetectable por citometría de flujo en células DU145 y PC-3 de tipo salvaje, la expresión de ARNm se detectó en estas líneas (FIGURA 13), que probablemente contribuyó a la elección por parte de las CARs que contienen CD28.

Se examinó el impacto de un scFv de PSCA alternativo, MB1 [33]. (FIGURA 14A). Si bien los PSCA-CARs que contienen 4-1BB basados en tanto MB1 como A11 se expresaron con una estabilidad similar (FIGURA 14B), los CARs que contienen el scFv de MB1 mostraron una elección significativa de las células tumorales de tipo salvaje en comparación con los CARs que contienen el scFv de A11 (FIGURA 14C). Estos datos sugieren que los dominios dirigidos a antígenos y coestimuladores funcionan en conjunto para proporcionar selectividad tumoral de los CARs, y que la no selectividad de un dominio puede anular la selectividad dirigida por otro dominio.

Además de la selectividad mejorada y la falta de mortalidad de las células tumorales de tipo salvaje que no expresan PSCA, las células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ exhibieron menos evidencia de agotamiento en comparación con las células CAR T PSCA(Δ CH2)28 ζ , como lo indica la expresión reducida de muerte programada-1 (PD-1) (FIGURA 8D). La diferencia en la expresión de PD-1 entre PSCA(Δ CH2)28 ζ y PSCA(Δ CH2)BB ζ se observó principalmente en el subconjunto CD8+ de células CAR T (FIGURA 8E). Además, se observaron tendencias similares, aunque menos robustas, con otros marcadores de agotamiento, incluidos LAG3 y TIM3 (datos no mostrados).

Un ensayo de mortalidad en el transcurso del tiempo, en el que la capacidad de eliminación de PSCA(Δ CH2)28 ζ y PSCA(Δ CH2)BB ζ en uno, dos y tres días de cocultivo con células tumorales se usó para examinar la cinética de la expresión de PD-1 (FIGURA 8F). Estos datos confirmaron cuantitativamente que PSCA(Δ CH2)28 ζ y PSCA(Δ CH2)BB ζ eliminaron a DU145-PSCA de manera equivalente con el tiempo, pero que PSCA(Δ CH2)28 ζ tenía una mayor expresión de PD-1.

En otro estudio, PSCA(Δ CH2)28 ζ y PSCA(Δ CH2)BB ζ se cultivaron conjuntamente contra una línea tumoral de baja expresión de PSCA (PC-3-PGK100p) y una línea tumoral de alta expresión de PSCA (PC-3-PSCA) a relaciones efector:diana (E:T) variables. Este estudio mostró que a relaciones E:T más bajas, PSCA(Δ CH2)BB ζ fueron más selectivas para células tumorales con alta expresión de PSCA en comparación con PSCA(Δ CH2)28 ζ (FIGURA 8G). Se observaron hallazgos similares usando células PSCA-CAR T derivadas de PBMC o T_{CM} (datos no mostrados). Juntos, estos datos sugieren que la coestimulación de 4-1BB permite la mortalidad potente y selectiva de células tumorales con alta expresión de PSCA al tiempo que minimiza la actividad contra las células con menor expresión de PSCA, mientras que los CARs que contienen CD28 carecen de dicha selectividad seleccionadora.

Ejemplo 8: Los PSCA-CARs que contienen 4-1BB demuestran producción moderada aunque selectiva de citocinas en comparación con los PSCA-CARs que contienen CD28.

Para investigar adicionalmente las diferencias entre los PSCA-CARs que contienen CD28 y 4-1BB, se realizaron estudios para comparar sus respectivas activación de células T y producción de citocinas. Estos estudios revelaron una disminución significativa de la producción de IFN γ por parte de las células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ en comparación con las células CAR T PSCA(Δ CH2)28 ζ después de un cocultivo nocturno con células tumorales DU145-PSCA (FIGURA 9A). Se observó una disminución similar de la producción de citocinas para los CARs que contienen 4-1BB contra PC-3-PSCA. Mientras que las células PSCA-CAR T que contienen CD28 producen niveles equivalentes de IFN γ contra células tumorales con expresión baja y alta de PSCA, las células CAR T que contienen 4-1BB producen menores niveles de IFN γ contra células tumorales con baja expresión de PSCA (FIGURA 9B). Para descartar posibles efectos no mediados por CAR sobre la producción de citocinas por las células tumorales, se realizaron medidas similares de IFN γ por las células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ contra la proteína PSCA humana recombinante unida a placa. Mientras que las células CAR T que contienen CD28 mostraron una respuesta saturada contra niveles bajos o altos de PSCA, la producción de IFN γ por las células PSCA-CAR T que contienen 4-1BB dependía de la densidad antigénica (FIGURA 9C). Se observaron respuestas similares de citocinas independientemente del subconjunto de células T usado para generar células PSCA-CAR T (FIGURA 15).

Los PSCA-CARs que contienen 4-1BB mostraron una ligera reducción en comparación con los CARs que contienen CD28 en la desgranulación de CD107a contra las células tumorales que expresan PSCA (FIGURA 9D y FIGURA 9E). Se observó por parte de PSCA(Δ CH2)28 ζ una selección significativa como dianas de células tumorales que no expresan PSCA, como se mide por la expresión de CD107a. El estado de activación de las células CAR T PSCA(Δ CH2)28 ζ y PSCA(Δ CH2)BB ζ fue comparable, como se mide por la expresión de 4-1BB (CD137) en un ensayo de mortalidad tumoral de 3 días (FIGURA 9F). Para garantizar que las diferencias en las células PSCA-CAR T se debieron a la selección de antígenos en lugar de un defecto intrínseco en la actividad de las células T, confirmamos una activación similar (CD137) y un agotamiento (PD-1) en las células T estimuladas con el anticuerpo anti-CD3 humano unido a placa, OKT3 (FIGURA 16).

Ejemplo 9: Las células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ demuestran una eficacia terapéutica robusta en modelos de cáncer de próstata subcutáneo.

En este estudio, los ratones con tumores subcutáneos PC-3-PSCA se trataron con una única inyección intratumoral de 5×10^6 células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ . Se observó regresión tumoral completa dentro de las dos semanas posteriores a la inyección intratumoral de células T. Aunque la regresión tumoral fue evidente durante más de 30 días, los tumores eventualmente recurrieron en la mayoría de los animales con una cinética similar a la del tumor primario (FIGURA 17A), que abordaremos a continuación. Para establecer si la terapia sistémica de las células CAR T se podía lograr en este modelo de tumor sólido, se administraron dosis variables de células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ por vía intravenosa. Si bien 5×10^6 células PSCA-CAR T mostraron una regresión completa de los tumores, se observó una eficacia terapéutica similar pero retrasada con una dosis de CAR tan pequeña como $0,25 \times 10^6$ (FIGURA 10A). Para extender los hallazgos a una gran carga tumoral, se trataron tumores PC-3-PSCA grandes ($\sim 500 \text{ mm}^3$) con una sola inyección intravenosa de 5×10^6 células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ . Aquí se observó una regresión tumoral rápida (FIGURA 10B). Se observó una infiltración tumoral significativa de células T humanas 11 días después de la infusión de células CAR T (FIGURA 10C, panel superior), que también expresó Granzyme B (FIGURA 10D, panel inferior), un marcador de actividad de células T. Los tumores de ratones tratados de forma simulada mostraron muy pocas células T humanas o expresión de Granzyme B en el mismo punto de tiempo.

La recurrencia después de la terapia individual con células CAR T específicas de antígeno podría ser un fenómeno esperado dado el perfil de antígeno heterogéneo de los tumores sólidos, pero los mecanismos subyacentes a la resistencia/recurrencia aún se están explorando. Para comprender mejor las recurrencias tumorales tardías que se observaron en la FIGURA 10A, se usó inmunohistoquímica para evaluar la presencia continua de antígeno en las células tumorales, y la persistencia de las células PSCA-CAR T. Curiosamente, mientras que los tumores tratados de forma simulada fueron altamente positivos para PSCA, los tumores que recurrieron después del tratamiento con células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ fueron negativos para PSCA (FIGURA 17B, panel superior). Sin embargo, en los mismos tumores recurrentes, las células T humanas eran abundantes (FIGURA 17B, panel central), a pesar de que estos tumores se cosecharon al menos 2 meses después de la infusión de células CAR T. Las células PC-3 también expresan HER2 *in vitro* (FIGURA 17C), y se confirmó que los tumores recurrentes tratados tanto de forma simulada como con PSCA(Δ CH2)BB ζ expresaban HER2 a niveles equivalentes *in vivo* (FIGURA 17B, panel inferior). Para determinar si los tumores eran negativos para PSCA y aún susceptibles a la terapia con células CAR T, los tumores recurrentes se trataron mediante inyección intratumoral con células CAR T, de forma simulada, dirigidas contra PSCA, o dirigidas contra HER2. Aunque los tumores recurrentes PSCA negativos no respondían a los PSCA-CARs, eran susceptibles al tratamiento con células T HER2-CAR (FIGURA 17D).

Ejemplo 10: Las células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ se trasladan al hueso y exhiben eficacia antitumoral en el cáncer de próstata metastásico óseo.

Uno de los principales obstáculos para la inmunoterapia celular es el microambiente inmunosupresor que puede dificultar el tráfico eficaz y la supervivencia de las células T en tumores sólidos. Para evaluar directamente el tráfico y la expansión de células CAR T dependientes de antígeno en tumores de próstata metastásicos óseos, células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ marcadas con luciferasa de luciérnaga se inyectaron i.v. en ratones con tumores intratibiales de tipo salvaje PC-3 (tibia anatómica derecha) y PC-3-PSCA (tibia anatómica izquierda). Curiosamente, mientras que las células T simuladas y PSCA-CAR mostraron un tráfico temprano igual a ambos tumores (a las 4 horas después de la infusión de células T), las células PSCA-CAR T se encontraron predominantemente en tumores que expresan PSCA al día siguiente de la inyección de células T, lo que aumentó durante los 4 días de imágenes cinéticas (FIGURA 10D), indicando un tráfico dependiente de antígeno y/o una proliferación de células CAR T en tumores positivos para PSCA. A continuación, se realizó un estudio en el que se inyectaron células tumorales PC-3-PSCA en el espacio intratibial. El día 14 después del injerto tumoral, estos ratones portadores de tumor se trataron por vía intravenosa con una reducción de la dosis de células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ ($0,5 \times 10^6$ a 5×10^6) (FIGURA 10E). La gran mayoría de los ratones tratados con 5×10^6 o $2,5 \times 10^6$ células CAR T mostraron regresión tumoral completa, mientras que los ratones tratados con 1×10^6 o $0,5 \times 10^6$ células CAR T tuvieron una respuesta terapéutica más heterogénea (FIGURA 10F). La relevancia clínica de este modelo es evidente cuando las dosis eficaces de los estudios ortotópicos se compararon con las dosis usadas en el modelo subcutáneo en el que se observó una regresión completa con dosis de células CAR T de tan solo $0,25 \times 10^6$. Es probable que la discrepancia en la terapia general observada en estos modelos se deba a diferencias en la infiltración y supervivencia de las células CAR T en estos microambientes tumorales.

Ejemplo 11: La coestimulación con 4-1BB proporciona una persistencia superior y respuestas antitumorales duraderas de los PSCA-CARs en un modelo de cáncer de próstata metastásico óseo clínicamente relevante.

Los estudios descritos anteriormente se ampliaron usando el xenoinjerto tumoral derivado del paciente con cáncer de próstata metastásico óseo que expresa PSCA endógeno, LAPC-9. El día 14 después del injerto tumoral, los ratones tratados con una sola inyección i.v. de 5×10^6 células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ mostraron una regresión casi completa de los tumores en el sitio del tumor intratibial (FIGURA 11A). Aunque los tumores intratibiales se seleccionaron de manera eficaz como dianas, los tumores LAPC-9 se diseminaron a otros sitios del cuerpo, que se encontraron particularmente evidentes en diversos ganglios linfáticos (axilares e inguinales) y el timo, según lo confirmado por inmunohistoquímica (datos no mostrados). Aunque estos aparentemente crecieron durante varias

semanas después de la regresión inicial del tumor en el hueso, finalmente fueron erradicados por las células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ .

Basado en el requisito de células T persistentes para la actividad antitumoral completa de los PSCA-CAR, se realizó un estudio para comparar los PSCA-CARs que contienen dominios coestimuladores CD28 o 4-1BB. Mientras que las células CAR T PSCA(Δ CH2)28 ζ y PSCA(Δ CH2)BB ζ mostraron una regresión drástica de las metástasis óseas, los ratones que recibieron PSCA-CARs que contenían CD28 mostraron recurrencia en el sitio del tumor primario, así como enfermedad metastásica, mientras que los ratones tratados con PSCA-CARs que contenían 4-1BB mostraron respuestas antitumorales completas (FIGURA 11A y FIGURA 11B). La recurrencia tumoral en ratones tratados con células CAR T PSCA(Δ CH2)28 ζ se confirmó cuantificando los niveles de PSA en la sangre en el día 76 después del tratamiento con células CAR T (FIGURA 10C). Las células CAR T se cuantificaron en la sangre de los animales tratados, y mientras que las células CAR T se observaron en ambos grupos el día 24 después de la inyección del tumor, las células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ fueron significativamente más abundantes en el día 76, lo que indica una mayor persistencia (FIGURA 10D). En general, estos estudios demuestran una eficacia antitumoral potente y duradera con células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ en múltiples sistemas tumorales, incluidos los modelos metastásicos óseos ortotópicos de cáncer de próstata.

Ejemplo 12: Construcción y estructura de epHIV7 usado para la expresión de CAR

El plásmido pHIV7 es el plásmido progenitor del que derivaron los diversos vectores de expresión de CAR en el T cell Therapeutics Research Laboratory (TCTRL) en City of Hope (COH). El vector epHIV7 usado para la expresión del CAR se produjo a partir del vector pHIV7. Es importante destacar que este vector usa el promotor EF1 humano para conducir la expresión del CAR. Ambas secuencias 5' y 3' del vector derivaron de pv653RSN como derivaron previamente del provirus HXBc2. Las secuencias del faldón de ADN del tramo de polipurina (cPPT) derivaron de la cepa pNL4-3 de VIH-1 del NIH AIDS Reagent Repository. La secuencia del elemento regulador post-transcripcional de marmota (WPRE) se describió previamente.

La construcción de pHIV7 se realizó como sigue. Brevemente, pv653RSN, que contiene 653 pb de gag-pol más repeticiones terminales largas (LTRs) de 5' y 3', con un gen de SL3-neomicina fosfotransferasa (Neo) interviniente, se subclonó en pBluescript, como sigue: en la Etapa 1, las secuencias desde 5' LTR hasta el elemento sensible a rev (RRE) formaron p5'HIV-1 51, y después la 5' LTR se modificó eliminando secuencias en dirección 5' de la caja TATA, y se ligó primero a un potenciador de CMV y después al origen de replicación de SV40 (p5'HIV-2). En la Etapa 2, después de clonar la 3' LTR en pBluescript para obtener p3'HIV-1, se realizó una eliminación de 400 pb en el potenciador/promotor de 3' LTR, para eliminar los elementos reguladores cis en HIV U3 y formar p3'HIV-2). En la Etapa 3, los fragmentos aislados de p5'HIV-3 y p3'HIV-2 se ligaron para obtener pHIV-3. En la Etapa 4, el p3'HIV-2 se modificó adicionalmente eliminando secuencias adicionales de VIH en dirección 5' para generar p3'HIV-3, y se añadió un fragmento BamHI-Sall de 600 pb que contenía WPRE a p3'HIV-3 para obtener el p3'HIV-4. En la Etapa 5, el pHIV-3 RRE se redujo en tamaño mediante PCR y se ligó a un fragmento de 5' de pHIV-3 (no mostrado) y al p3'HIV-4, para obtener pHIV-6. En la Etapa 6, un fragmento BgIII-BamHI de 190 pb que contiene la secuencia de faldón de ADN de cPPT de pNL4-3 (55) de VIH-1 se amplificó de pNL4-3 y se colocó entre las secuencias RRE y WPRE en pHIV6 para obtener pHIV-7. Este plásmido progenitor pHIV7-GFP (GFP, proteína fluorescente verde) se usó para empaquetar el vector progenitor usando un sistema de cuatro plásmidos.

Se requiere una señal de empaquetamiento, ψ , para el empaquetamiento eficiente del genoma viral en el vector. El RRE y WPRE mejoran el transporte del transcrito de ARN y la expresión del transgén. Se ha demostrado que la secuencia del faldón, en combinación con WPRE, mejora la eficiencia de transducción del vector lentiviral en células de mamífero.

Las funciones auxiliares, necesarias para la producción del vector viral, se dividen en tres plásmidos separados, para reducir la probabilidad de generación de lentivirus competente para la replicación mediante recombinación: 1) pCgp codifica la proteína gag/pol requerida para el ensamblaje del vector viral; 2) pCMV-Rev2 codifica la proteína Rev, que actúa en la secuencia RRE para ayudar en el transporte del genoma viral para un empaquetamiento eficiente; y 3) pCMV-G codifica la glicoproteína del virus de la vesiculoestomatitis (VSV), que se requiere para la infectividad del vector viral.

Hay una mínima homología de secuencia de ADN entre el genoma del vector codificado con pHIV7 y los plásmidos auxiliares. Las regiones de homología incluyen una región de señal de empaquetamiento de aproximadamente 600 nucleótidos, localizada en la secuencia gag/pol del plásmido auxiliar pCgp; una secuencia promotora de CMV en los tres plásmidos auxiliares; y una secuencia RRE en el plásmido auxiliar pCgp. Es altamente improbable que se pueda generar un virus recombinante competente para la replicación debido a la homología en estas regiones, ya que requeriría múltiples sucesos de recombinación. Además, a cualquier recombinante resultante le faltarían las secuencias funcionales LTR y tat requeridas para la replicación lentiviral.

El promotor CMV fue reemplazado por el promotor EF1 α -HTLV (EF1p), y el nuevo plásmido se denominó epHIV7. El EF1p tiene 563 pb, y se introdujo en epHIV7 usando NruI y NheI, después de que se eliminó el promotor CMV.

El genoma lentiviral, excluyendo gag/pol y rev que son necesarios para la patogenicidad del virus de tipo salvaje y son necesarios para la infección productiva de las células diana, se ha eliminado de este sistema. Además, el constructo del vector CLRX-IgG4Fc(EQ)-CD28-zeta-T2ACD19t_epHIV7 no contiene un promotor 3'LTR intacto, de modo que el genoma proviral resultante de ADN expresado y transcrito de forma inversa en células seleccionadas como diana tendrá LTRs inactivas. Como resultado de este diseño, no se transcribirán secuencias derivadas de VIH-1 del provirus, y solo se expresarán las secuencias terapéuticas de sus respectivos promotores. Se espera que la eliminación de la actividad del promotor LTR en el vector SIN reduzca significativamente la posibilidad de activación involuntaria de los genes hospedantes.

Ejemplo 13: Producción de vectores para la transducción de células T

10 Para cada plásmido que expresa un CAR, se generó un banco de semillas, que se usa para inocular el fermentador para producir cantidades suficientes de ADN plasmídico. El ADN plasmídico se analizó para determinar su identidad, esterilidad y endotoxina antes de su uso en la producción del vector lentiviral.

15 Brevemente, las células se expandieron desde la célula de trabajo 293T (WCB), que se ha ensayado para confirmar la esterilidad y la ausencia de contaminación viral. Se descongeló un vial de células 293T del WCB. Las células se hicieron crecer y se expandieron hasta que existió un número suficiente de células para colocar en placa un número apropiado de fábricas de células de 10 capas (CF) para la producción de vectores y el mantenimiento del tren celular. Se puede usar un solo tren de células para la producción.

20 El vector lentiviral se produjo en sublotos de hasta 10 CFs. Se pueden producir dos sublotos en la misma semana, lo que lleva a la producción de aproximadamente 20 l de sobrenadante lentiviral/semana. El material producido a partir de todos los sublotos se combinó durante la fase de procesamiento posterior, para producir un lote de producto. Las células 293T se sembraron en placas en CFs en medio 293T (DMEM con FBS al 10%). Las fábricas se colocaron en una incubadora a 37°C y se nivelaron horizontalmente para obtener una distribución uniforme de las células en todas las capas de la CF. Dos días después, las células se transfectaron con los cuatro plásmidos lentivirales descritos anteriormente usando el método de CaPO₄, que implica una mezcla de Tris:EDTA, CaCl₂ 2M, 2X HBS, y los cuatro plásmidos de ADN. El día 3 después de la transfección, el sobrenadante que contiene los vectores lentivirales segregados se recogió, se purificó y se concentró. Después de eliminar el sobrenadante de las CFs, se recogieron las células de fin de producción de cada CF. Las células se tripsinizaron de cada fábrica y se recogieron por centrifugación. Las células se resuspendieron en medio de congelación y se criopreservaron. Estas células se usaron más tarde para el ensayo de lentivirus competente para la replicación (RCL).

30 Para purificar y formular vectores, el sobrenadante bruto se clarificó por filtración con membrana para eliminar el desecho celular. El ADN de la célula hospedante y el ADN plasmídico residual se degradaron por digestión con endonucleasa (Benzonase®). El sobrenadante viral se eliminó del desecho celular usando un filtro de 0,45 µm. El sobrenadante clarificado se recogió en un recipiente previamente pesado en el que se añade Benzonase® (concentración final 50 U/ml). La digestión con endonucleasa para el ADN plasmídico residual y el ADN genómico hospedante se realizó a 37°C durante 6 h. La concentración por ultrafiltración de flujo tangencial (TFF) inicial del sobrenadante tratado con endonucleasa se usó para eliminar componentes residuales de bajo peso molecular del sobrenadante bruto, mientras se concentraba el virus ~20 veces. El sobrenadante viral tratado con endonucleasa clarificado se hizo circular a través de un cartucho de fibra hueca con un NMWCO de 500 kD a un caudal diseñado para mantener la velocidad de cizallamiento a ~4.000 s⁻¹ o menos, mientras se maximiza el caudal. La diafiltración del sobrenadante tratado con nucleasa se inició durante el proceso de concentración para mantener el rendimiento del cartucho. Se estableció una tasa de reemplazo de permeado del 80%, usando lactosa al 4% en PBS como el amortiguador de diafiltración. El sobrenadante viral se llevó al volumen diana, lo que representa una concentración de 20 veces del sobrenadante bruto, y la diafiltración continuó durante 4 volúmenes de intercambio adicionales, con una tasa de reemplazo de permeado al 100%.

45 Se logró una mayor concentración del producto viral usando una técnica de centrifugación de alta velocidad. Cada sublote del lentivirus se peletizó usando una centrifuga Sorvall RC-26 plus a 6000 RPM (6.088 RCF) a 6°C durante 16-20 h. El pelete viral de cada sublote se reconstituyó entonces en un volumen de 50 ml con lactosa al 4% en PBS. El pelete reconstituido en este amortiguador representa la formulación final para la preparación del virus. Todo el proceso de concentración del vector dio como resultado una reducción de volumen de 200 veces, aproximadamente. Después de completar todos los sublotos, el material se colocó entonces a -80°C, mientras que las muestras de cada sublote se analizaron para determinar la esterilidad. Tras la confirmación de la esterilidad de las muestras, los sublotos se descongelaron rápidamente a 37°C con agitación frecuente. El material se agrupó entonces y se dividió en alícuotas manualmente en el gabinete de bioseguridad de Clase II Tipo A/B3 en el conjunto de vectores virales. Se usó una configuración de llenado de 1 ml del lentivirus concentrado en crioviales de junta tórica roscados externamente USP clase 6 estériles. Los Sistemas de Calidad (QS) del Centro para el Desarrollo de Tecnología Aplicada (CATD) de COH liberaron todos los materiales de acuerdo con las Políticas y los Procedimientos Operativos Estándar para el CBG y de conformidad con las Buenas Prácticas de Fabricación actuales (cGMPs).

Para garantizar la pureza de la preparación del vector lentiviral, se analizó para determinar la presencia de contaminantes de ADN hospedante residual, y la transferencia de ADN hospedante y plasmídico residual. Entre

otros ensayos, la identidad del vector se evaluó por RT-PCR para asegurar que el vector correcto esté presente. Todos los criterios de liberación se cumplieron para el vector destinado a ser usado en este estudio.

Ejemplo 14: Preparación de células T adecuadas para la expresión de CAR dirigido contra PSCA

5 Los linfocitos T se obtienen de un paciente mediante leucocitaféresis, y el subconjunto de células T alogénicas o autólogas apropiadas, por ejemplo células T de memoria central (T_{CM}), se modifican genéticamente para expresar el CAR, después se administran nuevamente al paciente por cualquier medio clínicamente aceptable, para lograr la terapia contra el cáncer.

10 Las T_{CM} adecuadas se pueden generar de la siguiente manera. Los productos de aféresis obtenidos de participantes de investigación que dieron su autorización se tratan con Ficol, se lavan y se incuban durante la noche. Después, las células se agotan de las poblaciones de monocitos, células T reguladoras y células T vírgenes usando reactivos GMP anti-CD14, anti-CD25 y anti-CD45RA (Miltenyi Biotec) y el dispositivo de separación CliniMACS™. Después del agotamiento, las células de fracción negativa se enriquecen para células T_{CM} CD62L+ que usan DREG56-biotina (grado clínico COH) y microperlas anti-biotina (Miltenyi Biotec) en el dispositivo de separación CliniMACS™.

15 Después del enriquecimiento, las células T_{CM} se formulan en X-Vivo15 completo más 50 UI/ml de IL-2 y 0,5 ng/ml de IL-15, y se transfieren a una bolsa de cultivo celular de teflón, en la que se estimulan con perlas Dynal ClinEx™ Vivo CD3/CD28. Hasta cinco días después de la estimulación, las células se transducen con un vector lentiviral que expresa el CAR deseado a una multiplicidad de infección (MOI) de 1,0 a 0,3. Los cultivos se mantienen hasta 42 días con la adición de X-Vivo15 completo y citocinas IL-2 e IL-15 según sea necesario para la expansión celular (manteniendo la densidad celular entre 3×10^5 y 2×10^6 células viables/ml, y suplementación de citocinas todos los lunes, miércoles y viernes de cultivo). Las células típicamente se expanden a aproximadamente 10^9 células en estas condiciones en 21 días. Al final del período de cultivo, las células se cosechan, se lavan dos veces y se formulan en un medio de crioconservación de grado clínico (Cryostore CS5, BioLife Solutions).

25 En el o los días de infusión de células T, el producto crioconservado y liberado se descongela, se lava y se formula para la reinfusión. Los viales crioconservados que contienen el producto celular liberado se retiran del almacenamiento de nitrógeno líquido, se descongelan, se enfrían y se lavan con un amortiguador de lavado PBS/2% de seroalbúmina humana (HSA). Después de la centrifugación, se retira el sobrenadante, y las células se resuspenden en un diluyente de infusión de disolución salina normal libre de conservantes (PFNS)/2% de HSA. Se extraen muestras para ensayos de control de calidad.

Técnicas usadas en los Ejemplos 7-11

30 Líneas celulares: Se cultivaron líneas celulares de cáncer de próstata metastásico humano DU145 (ATCC HTB-81) y PC-3 (ATCC CRL-1435) en RPMI-1640 (Lonza) que contiene 10% de suero fetal bovino (FBS, Hyclone), y 1x antibiótico-antimicótico (Gibco) que contiene 100 U/ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomina, y 0,25 ug/ml de fungizona (RPMI completo). La línea celular de fibrosarcoma humano, HT1080 (ATCC CCL-121), y la línea celular de riñón embrionario humano, 293T (ATCC CRL-3216), se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Life Technologies) que contiene 10% de FBS, 1x antibiótico-antimicótico, HEPES 25 mM (Irvine Scientific) y L-Glutamina 2 mM (Fisher Scientific) (DMEM completo). El xenoinjerto de cáncer de próstata humano LAPC-9 (un obsequio del Dr. Robert Reiter, UCLA) se cultivó en medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM, Irvine Scientific) que contiene 20% de FBS y 1x antibiótico-antimicótico (IMDM completo). Las células LAPC-9 se hicieron pasar en serie en ratones machos NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG), y se prepararon suspensiones unicelulares como se describió previamente (Craft et al. 1999 Cancer Res 59:5030). Brevemente, se cosechó tejido tumoral, se trituró en una placa de Petri, y se digirió con 1% de Pronase E (Roche). Después de un lavado con IMDM completo, las suspensiones unicelulares se filtraron a través de un filtro de células de 40 μ m (Falcon), se lavaron nuevamente, y se congelaron inmediatamente. Una línea celular linfoblastoidea (LCL) transformada por EBV, y células LCL que contienen un agonista de scFv específico de CD3 épsilon unido a membrana OKT3 (LCL-OKT3(Wang et al. 2011 Blood 117:1888)), se cultivaron en RPMI completo. Todas las células se cultivaron a 37°C con 5% de CO₂. Las células DU145 y PC-3 se autenticaron mediante la obtención del perfil por STR, y se verificó que eran negativas a micoplasma (DDC Medical, OH).

45 Constructos de ADN y producción de lentivirus: Las células tumorales DU145 y PC-3 se manipularon para expresar PSCA mediante transducción con lentivirus ePHIV7 que porta el gen PSCA humano (nº de acceso: NM_005672.4) bajo el control del promotor EF1 α . Las células PSCA⁺ se tiñeron con el anticuerpo de ratón anti-PSCA humano (1G8) como se describe a continuación (véase la sección "Tinción intracelular/extracelular y citometría de flujo"), y después se clasificaron mediante FACS usando el clasificador celular BD FACSAria™ Special Order Research Product (SORP). Para la generación de células tumorales con baja expresión de PSCA, el gen de PSCA se colocó bajo el control de versiones mutadas del promotor PGK como se describió anteriormente (Frigault et al. 2015 Cancer Immunol Res 3:356). La secuencia de scFv de A11 (Lepin et al. 2010 Eur J Nucl Med Mol Imaging 37:529) fue amablemente proporcionada por los Dres. Anna Wu y Robert Reiter (UCLA). La secuencia de scFv de MB1 se publicó previamente (Feldmann et al. 2012 J Immunol 189:3249). Los constructos de CAR con un gen CD19 truncado (CD19t) separado por una secuencia de omisión ribosómica T2A se clonaron en una cadena principal

lentiviral epHIV7. El dominio que se dirige contra el antígeno incluyó el scFv de A11 o de MB1. El dominio espaciador extracelular incluyó la versión de longitud media de 129 aminoácidos sin CH2 (Δ CH2) del espaciador Fc de IgG4 (Jonnalagadda et al. 2015 Mol Ther 23:757). El dominio de señalización coestimulador intracelular contenía aquel de CD28 con un dominio transmembránico CD28, o de 4-1BB con un dominio transmembránico CD4. El dominio citolítico CD3 ζ se describió previamente (Cooper et al. 2003 Blood 101:1637).

El lentivirus se generó cultivando células 293T en matraces de cultivo tisular T-225 1 día antes de la transfección con plásmidos de empaquetamiento y el plásmido de esqueleto lentiviral de CAR deseado. Los sobrenadantes se recogieron después de 3 a 4 días, se filtraron y se centrifugaron para eliminar el desecho celular, y se incubaron con magnesio 2 mM y endonucleasa Benzonase® 25 U/ml (EMD Millipore) para eliminar los ácidos nucleicos contaminantes. Los sobrenadantes se combinaron y se concentraron mediante centrifugación a alta velocidad (6080 g) durante la noche a 4°C. Los peletes lentivirales se resuspendieron entonces en disolución de lactosa en disolución salina amortiguada con fosfato (PBS) (4 g de lactosa por 100 ml de PBS), se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80°C para su uso posterior. Los títulos lentivirales, según lo determinado por la expresión de CD19t, se cuantificaron usando células HT1080.

Aislamiento de células T, transducción lentiviral y expansión *ex vivo*: Los productos de leucocitaféresis se obtuvieron de participantes de la investigación que dieron su autorización (donantes sanos) bajo protocolos aprobados por la Junta de Revisión Interna (IRB) de City of Hope (COH). El día de la leucocitaféresis, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación por gradiente de densidad sobre Ficoll-Paque (GE Healthcare), seguido de múltiples lavados en PBS/EDTA (Miltenyi Biotec). Las células se dejaron reposar durante la noche a temperatura ambiente (RT) en un rotador, y posteriormente se lavaron y se resuspendieron en X-VIVO completo. Para los estudios que usan PBMC total, las células se congelaron inmediatamente en medios de crioconservación CryoStor® CS5 (BioLife Solutions). Se incubaron hasta 5×10^9 PBMC con microperlas anti-CD14, anti-CD25, y anti-CD45RA (Miltenyi Biotec) durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se agotaron magnéticamente usando el sistema CliniMACS® (Miltenyi Biotec) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las PBMCs agotadas se enriquecieron entonces para las células T de memoria central (T_{CM}) incubando con anticuerpo biotinilado anti-CD62L (producido por el Center for Biomedicine and Genetics en City of Hope) durante 30 minutos a temperatura ambiente, y después con microperlas anti-biotina (Miltenyi Biotec) durante 30 minutos adicionales a temperatura ambiente. Las T_{CM} se enriquecieron entonces magnéticamente usando el sistema autoMACS® (Miltenyi Biotec) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para estudios que usan T_{CM} , las células se congelaron inmediatamente como se describe anteriormente. La pureza y el fenotipo de las PBMC y T_{CM} se verificaron por citometría de flujo.

Las PBMC o T_{CM} recién descongeladas se lavaron una vez y se cultivaron en X-VIVO-15 (Lonza) con 10% de FBS (X-VIVO completo) que contenía 100 U/ml de IL-2 humana recombinante (rhIL-2, Novartis Oncology) y 0,5 ng/ml de IL-15 humana recombinante (rhIL-15, CellGenix). Para la transducción lentiviral de CAR, las células T se cultivaron con CD3/CD28 Dynabeads® (Life Technologies), sulfato de protamina (APP Pharmaceuticals), mezcla de citocinas (como se indicó anteriormente), y lentivirus deseado a MOI variable el día de la estimulación con perlas o al día siguiente. La espinoculación se realizó por centrifugación a 2000 rpm durante 30 minutos a 32°C sin freno. Después, las células se cultivaron y se repusieron con X-VIVO completo reciente que contiene citocinas, cada 2-3 días. Después de 7-9 días, las perlas se eliminaron magnéticamente, y las células se expandieron adicionalmente X-VIVO completo que contiene citocinas, para lograr el rendimiento celular deseado. Las células CAR T se seleccionaron positivamente para CD19t usando el Kit de enriquecimiento positivo EasySep™ CD19 Positive Enrichment Kit I o II (StemCell Technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de una expansión adicional, las células se congelaron antes de los ensayos funcionales *in vitro* y modelos tumorales *in vivo*. La pureza y el fenotipo de las células CAR T se verificaron por citometría de flujo.

Tinción intracelular/extracelular y citometría de flujo: Para el análisis de citometría de flujo, las células se resuspendieron en amortiguador de FACS (disolución salina equilibrada de Hank sin Ca^{2+} , Mg^{2+} , o rojo fenol (HBSS⁻, Life Technologies) que contiene 2% de FBS y 1x antibiótico-antimicótico). Para la tinción de PSCA, el Dr. Robert Reiter, UCLA, proporcionó amablemente el anticuerpo de ratón anti-PSCA humano (1G8). Para detectar scFv de CAR, se usó la proteína L biotinilada (GenScript USA) como se describió anteriormente [35]. Las células se incubaron con anticuerpos primarios durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad antes de proceder a la tinción secundaria. Para la tinción extracelular y secundaria, las células se lavaron dos veces antes de 30 minutos de incubación a 4°C en la oscuridad con anticuerpos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), complejo de clorofila-proteína peridina (PerCP), PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, alofocianina (APC), y APC-Cy7 (o APC-eFluor780) (CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD25, CD45 específico de ratón o de humano, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD95, CD107a, CD137, LAG3 (CD223), PD-1 (CD279), TIM3 (CD366), CCR7, IFN γ , Ig de cabra anti-ratón, y estreptavidina) adquiridos de BioLegend, eBioscience, BD Biosciences o Fisher Scientific. La viabilidad celular se determinó usando 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma). Para la tinción intracelular, las células se fijaron, se permeabilizaron y se procesaron de acuerdo con el protocolo del fabricante del kit de apoptosis de caspasa-3 activa conjugada con PE (BD Biosciences). Después, las células se incubaron con anticuerpos conjugados con fluoróforos durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad, y se lavaron dos veces antes de la resuspensión en amortiguador de

FACS y la adquisición en el MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec). Los datos se analizaron con el software FlowJo (v10, TreeStar).

5 Ensayos funcionales *in vitro* de células T: Para los ensayos de desgranulación y de citocinas intracelulares, las células CAR T y las dianas tumorales se cultivaron en diferentes proporciones efector:diana en X-VIVO completo sin citocinas exógenas en placas tratadas con cultivo tisular de 96 pocillos de fondo redondo (Corning). Se añadió FITC-CD107a a los cultivos, y después de incubar durante 4 - 6 horas a 37°C, las células se fijaron y se permeabilizaron antes del análisis por citometría de flujo como se describió anteriormente. Para los ensayos de mortalidad tumoral, las células CAR T y las dianas tumorales se cocultivaron en diferentes relaciones efector:diana en X-VIVO completo sin citocinas exógenas en placas de 96 pocillos durante 1 - 5 días, y se analizaron por citometría de flujo como se describió anteriormente. La muerte del tumor por las células CAR T se calculó comparando los recuentos de células CD45 negativas con respecto a lo observado por las células T de simulación.

15 Ensayos ELISA y de citocinas multiplex: Se revistieron durante la noche concentraciones variables de proteína PSCA humana recombinante (aminoácidos 23-95; Abnova) en 1x PBS a 4°C en placas de fondo plano de 96 pocillos de alta afinidad (Corning). Los pocillos se lavaron dos veces con 1x PBS, se bloquearon con FBS al 10% durante 1 h, y se lavaron nuevamente. Se añadieron células CAR T (5×10^3 en 200 μ l) a los pocillos revestidos. Cuando se especifique, las dianas tumorales (5×10^3) se incubaron con células T en pocillos no revestidos (volumen final de 200 μ l). Después de una incubación nocturna a 37°C, los sobrenadantes se cosecharon y procesaron de acuerdo con el protocolo del fabricante de Human IFN γ ELISA Ready-SET-GO!® (eBioscience) Las placas se leyeron a 450 nm usando el Wallac Victor3 1420 Multilabel Counter (Perkin-Elmer) y el software Wallac 1420 Workstation. Alternativamente, los sobrenadantes se analizaron en busca de múltiples citocinas usando el Multiplex Bead Immunoassay Kit (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ELISA de PSA/KLK3 humano (Abcam) en suero de ratón se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante.

25 PCR cuantitativa: Células tumorales (colocadas en placa a $0,25 \times 10^6$ /ml) se cultivaron durante un día antes del aislamiento de ARN. El ARN se extrajo usando la purificación de columna del RNeasy® Mini Kit (Qiagen). El ADNc se preparó usando SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen). Los cebadores de ARN se generaron usando TaqMan® Gene Expression Assays específicos para PSCA (Hs04166224_g1, Life Technologies) o GAPDH (Hs02758991_g1, Life Technologies). La qPCR se realizó en ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher). Los conjuntos de cebadores se validaron usando un patrón estándar a lo largo de un intervalo dinámico especificado con un solo pico de curva de fusión. La expresión de genes diana se normalizó a GAPDH.

30 Estudios tumorales *in vivo*: Todos los experimentos con animales se realizaron bajo protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de City of Hope. Para estudios tumorales subcutáneos, células PC-3 y DU145 ($2,5 \times 10^6$) se prepararon en HBSS^{-/-} y se inyectaron por vía subcutánea en el abdomen depilado izquierdo de ratones machos NSG. El crecimiento tumoral se monitorizó 3 veces por semana a través de la medida del calibrador. Una vez que los volúmenes tumorales alcanzaron 50 - 500 mm³, las células CAR T se prepararon en PBS y se inyectaron por vía intratumoral (i.t.) o intravenosa (i.v.). Una vez que los tumores alcanzaron 15 mm de diámetro, los ratones fueron sacrificados, y los tumores se cosecharon y procesaron para inmunohistoquímica como se describe a continuación. Cuando los tumores subcutáneos reaparecieron, los ratones fueron tratados por inyección i.t. con PSCA-CARs o HER2-CARs. Se recogió sangre periférica de ratones anestesiados con isoflurano mediante sangrado retroorbital (RO) a través de tubos capilares heparinizados (Chase Scientific) y en tubos de poliestireno que contenían una disolución de heparina/PBS (1000 unidades/ml, Sagent Pharmaceuticals). Se recogieron aproximadamente 150 μ l de sangre por ratón. La sangre se lisó con 1x Red Cell Lysis Buffer (Sigma) de acuerdo con el protocolo del fabricante, y luego se lavó, se tiñó y se analizó por citometría de flujo como se describió anteriormente.

45 Para los estudios de tumores ortotópicos intratibiales, LAPC-9 y PC-3-PSCA se transdujeron con lentivirus con proteína fluorescente verde mejorada (eGFP)/luciferasa de luciérnaga (ffluc) para permitir la obtención de imágenes ópticas no invasiva (Xenogen) una vez implantadas en ratones (líneas resultantes denominadas LAPC-9-eGFP-ffluc and PC-3-PSCA-eGFP-ffluc). Brevemente, estas líneas se incubaron con polibreno (4 mg/ml, Sigma) y el lentivirus eGFP-ffluc (véase anteriormente), seguido de la clasificación celular para células GFP⁺ usando el clasificador de células BD FACSAria™ SORP. Las células LAPC-9-eGFP-ffluc recién clasificadas se hicieron pasar en serie en ratones NSG como se describió anteriormente. Las células PC-3-PSCA-eGFP-ffluc (2×10^5) o las células LAPC-9-eGFP-ffluc ($1,5 \times 10^5$) se prepararon como en modelos subcutáneos. Los ratones se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal (i.p.) de ketamina/xilazina e isoflurano gaseoso, antes de la inyección del tumor. Se inyectaron células tumorales (en 30 μ l de HBSS^{-/-}) en el espacio intratibial de la pata trasera del ratón. Después de 14 días, los ratones se inyectaron i.v. con células CAR T. El crecimiento tumoral se monitorizó mediante imágenes ópticas quincenales (IVIS, Xenogen), y las señales de flujo se analizaron con el software Living Image (Xenogen). Para la obtención de imágenes, a los ratones se les inyectó i.p. 150 μ l de sal de potasio de D-luciferina (Perkin Elmer) suspendida en PBS, a 4,29 mg/ratón.

Para los estudios de tráfico de células T, a los ratones se les implantaron en el espacio intratibial derecho células PC-3 de tipo salvaje (2×10^5), y en el espacio intratibial izquierdo células PC-3-PSCA (2×10^5). Después de 14 días,

5 a los ratones se les inyectó i.v. 5×10^6 células T de simulación o células CAR T PSCA(Δ CH2)BB ζ que habían sido transducidas conjuntamente con lentivirus que portaba eGFP-ffluc. Las células T se enriquecieron con CAR, y se determinó que eran aproximadamente 30% eGFP⁺ por citometría de flujo. El tráfico de células T se monitorizó mediante imágenes ópticas no invasivas (Xenogen) a las 4 horas, 1 día, 2 días y 4 días después de la infusión de células T. Las señales de flujo se analizaron como se describe anteriormente.

10 Inmunohistoquímica: El tejido tumoral se fijó durante hasta 3 días en paraformaldehído al 4% (Boston BioProducts) y se almacenó en etanol al 70% hasta su posterior procesamiento. La histología fue realizada por el Pathology Core en City of Hope. Brevemente, las secciones incluidas en parafina (10 μ m) se tiñeron con anticuerpo de ratón anti-CD3 humano (DAKO), anticuerpo de ratón anti-PSCA humano (Abcam), anticuerpo de rata anti-HER2 humano (DAKO) y anticuerpo de rata anti-Granzyme-B humana (eBioscience). Las imágenes se obtuvieron usando el escáner de diapositivas digital Nanozoomer 2.0HT y el software NDP.view2 asociado (Hamamatsu).

15 Análisis estadístico: Los datos se presentan como media \pm SEM, a menos que se indique lo contrario. Para calcular el valor p, se realizaron comparaciones estadísticas entre grupos usando la prueba de la t de Student de dos colas no apareada. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001; ns, no significativo.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico, en el que la molécula de ácido nucleico expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 26, 28, 30, 32, 34, y 36.
- 5 2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que la molécula de ácido nucleico expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 26 y 32.
3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que la molécula de ácido nucleico expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 28 y 34.
- 10 4. Una población de células T humanas que comprende un vector que expresa un receptor de antígeno quimérico que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 26, 28, 30, 32, 34, y 36.
5. La población de células T humanas de la reivindicación 4, en la que la molécula de ácido nucleico expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 26 y 32.
6. La población de células T humanas de la reivindicación 4, en la que el vector expresa un receptor de antígeno quimérico que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 28 y 34.
- 15 7. La población de células T humanas de las reivindicaciones 4-6, en la que las células T están compuestas por una población de células T de memoria central.
8. Una composición que comprende una población de células T humanas autólogas o alogénicas transducidas por un vector que comprende un casete de expresión que codifica un receptor de antígeno quimérico, en la que el receptor de antígeno quimérico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 26, 28, 30, 32, 34, y 36, para uso en un método de tratamiento de cáncer en un paciente, comprendiendo el método administrar dicha composición.
- 20 9. La composición para uso de la reivindicación 8, en la que el receptor de antígeno quimérico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 26 y 32.
- 25 10. La composición para uso de la reivindicación 8 o 9, en la que la población de células T humanas comprende células T de memoria central.
11. La composición para uso de la reivindicación 8 o 9, en la que el cáncer es cáncer de próstata, o en la que el cáncer es una metástasis ósea de cáncer de próstata.
12. La composición para uso de la reivindicación 8 o 9, en la que el cáncer es cáncer pancreático.
- 30 13. La composición para uso de la reivindicación 8, en la que las células T humanas transducidas se prepararon mediante un método que comprende obtener células T del paciente, tratar las células T para aislar las células T de memoria central, y transducir al menos una porción de las células de memoria central con un vector viral que comprende un casete de expresión que codifica un receptor de antígeno quimérico, en la que el receptor de antígeno quimérico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 26, 28, 30, 32, 34, y 36.
- 35 14. Una célula T que expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 26, 28, 30, 32, 34, y 36.
15. La célula T de la reivindicación 14, en la que la secuencia de aminoácidos se selecciona de SEQ ID NOs: 26 y 32.

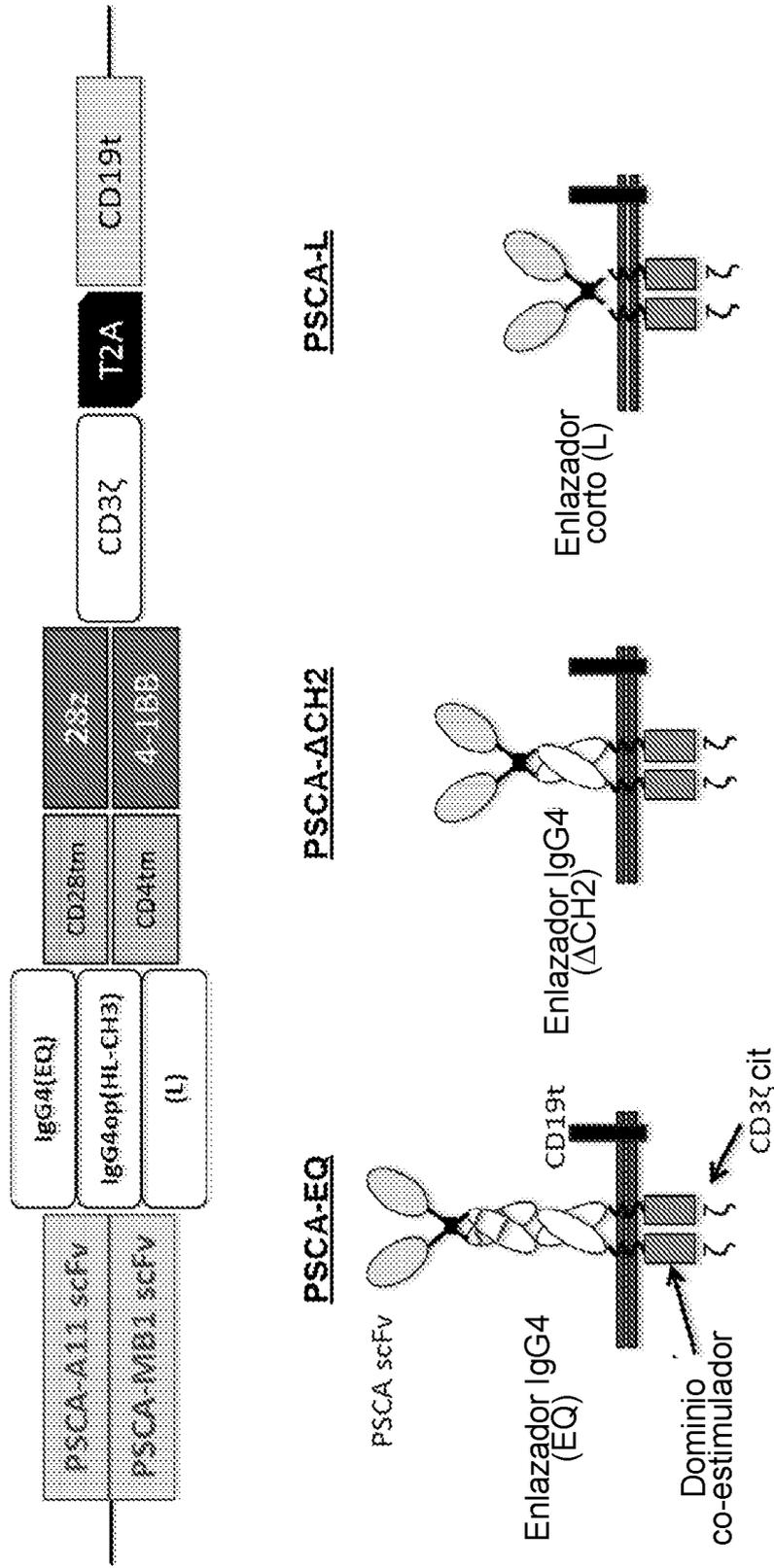


FIG. 1

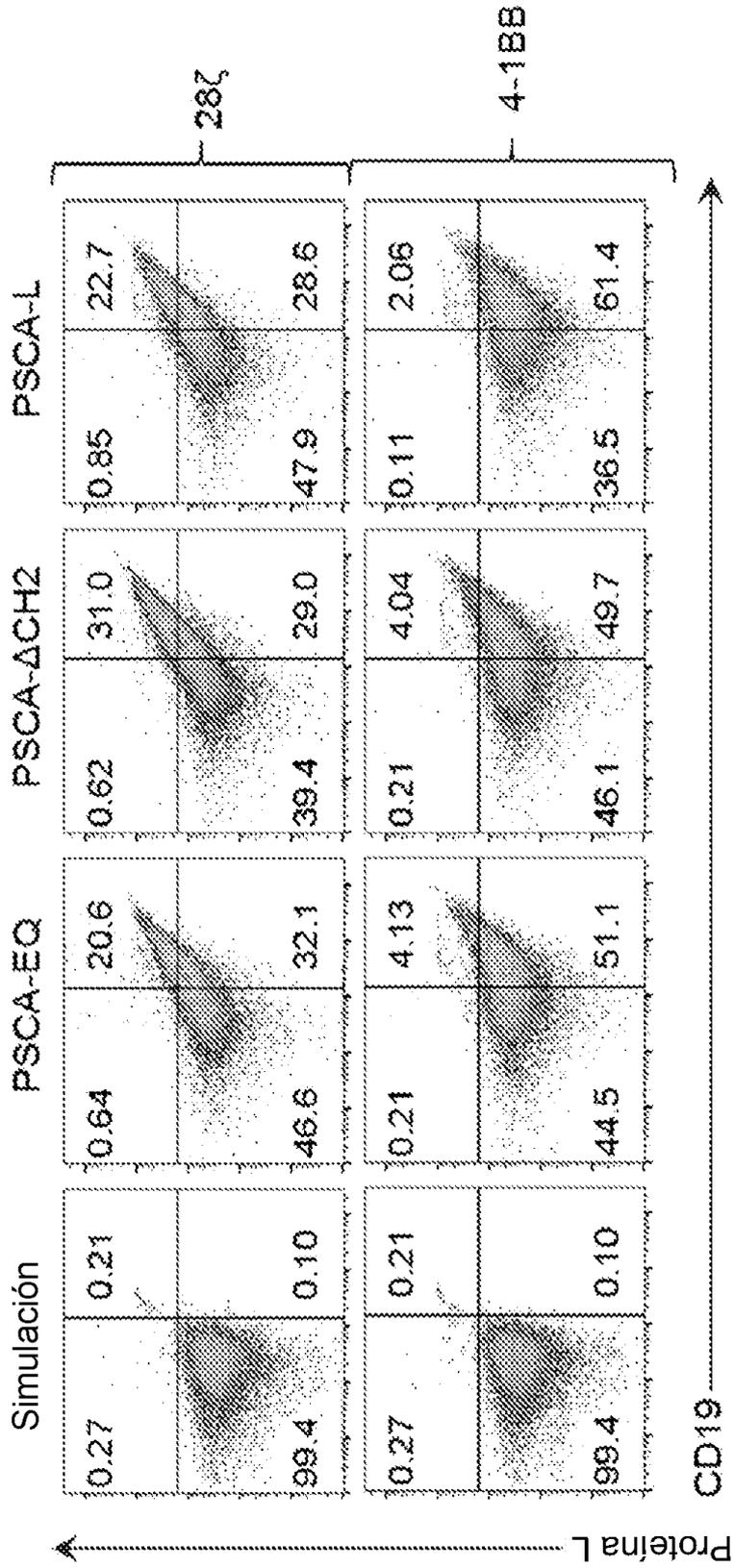


FIG. 2

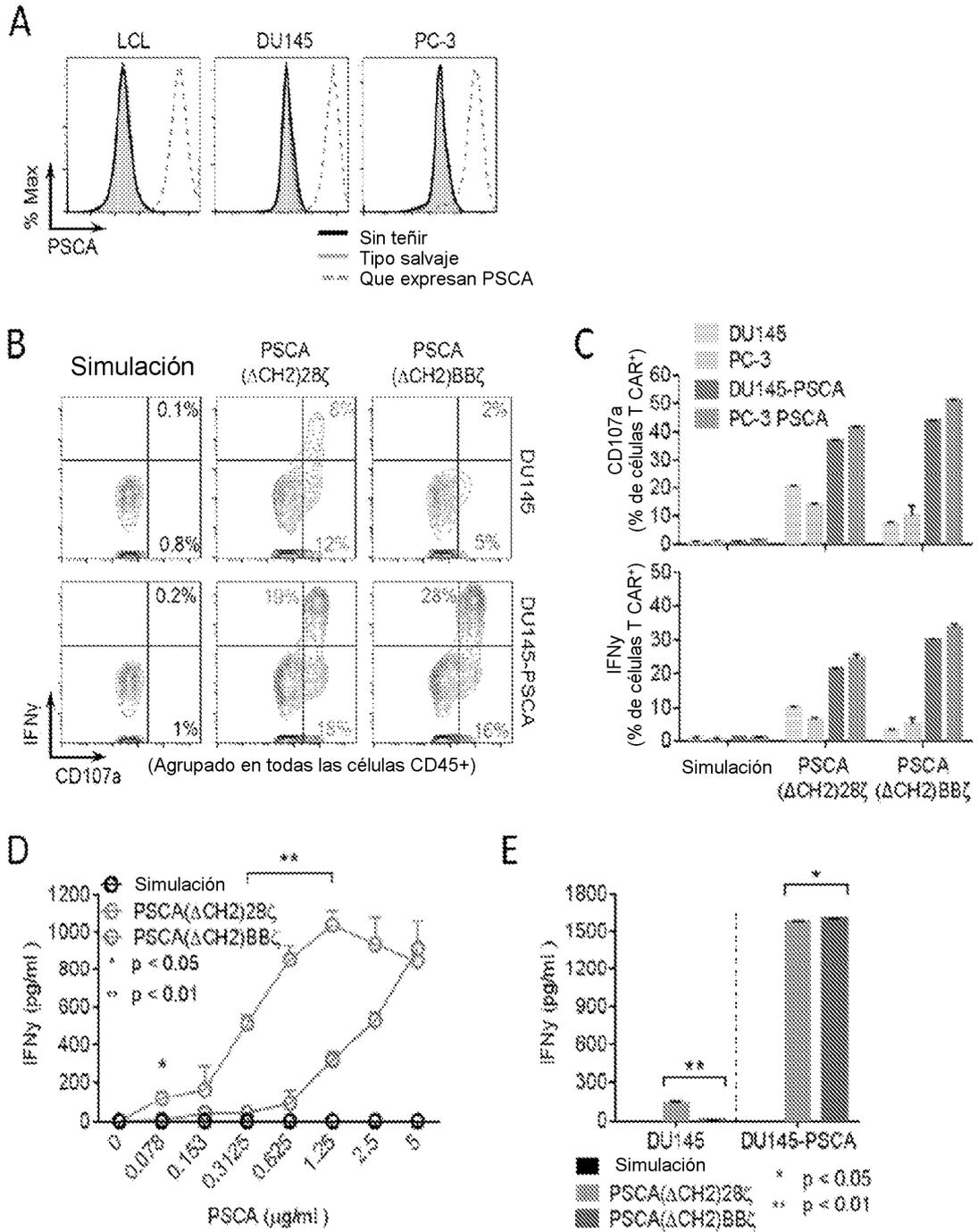


FIG. 3

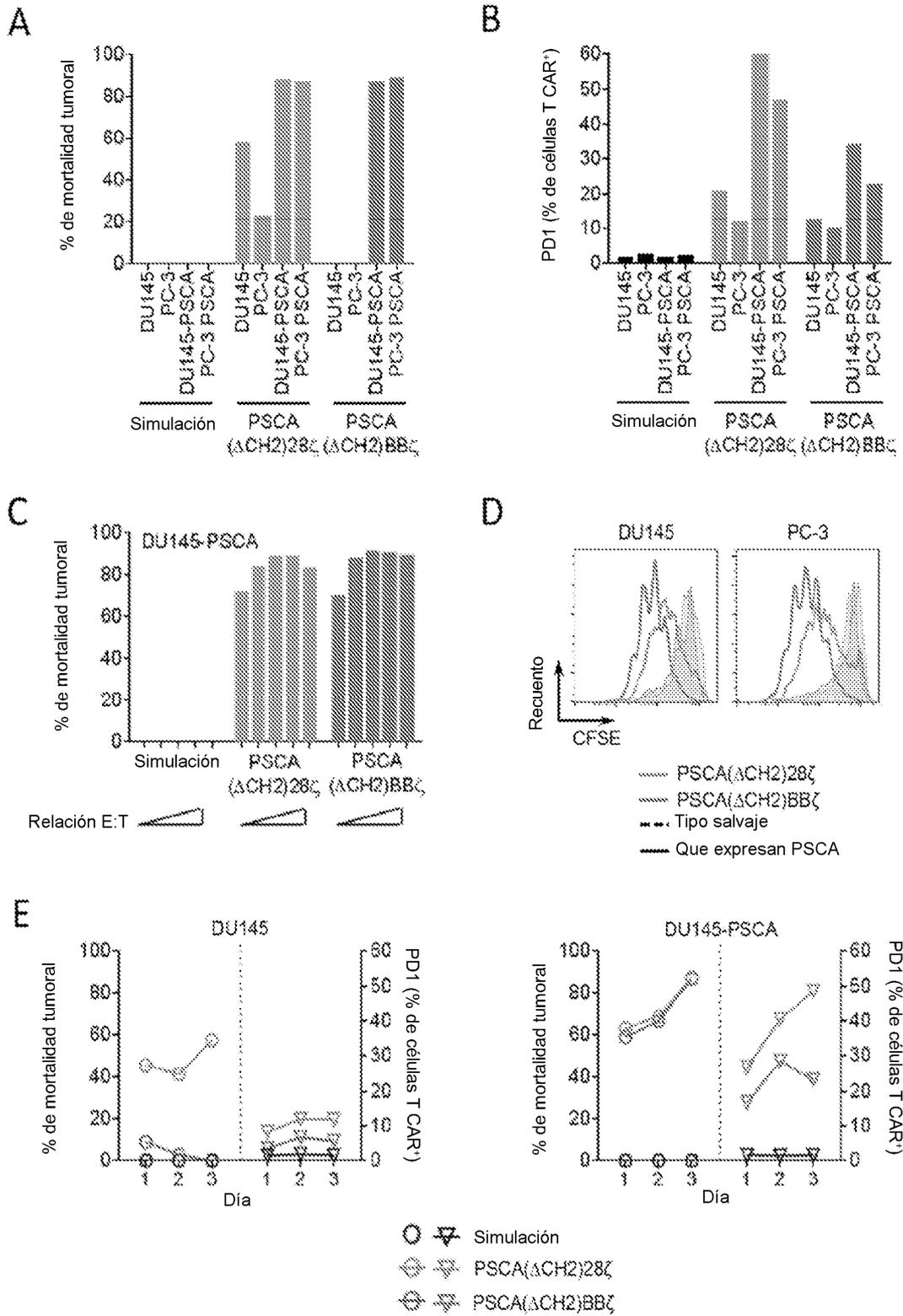


FIG. 4

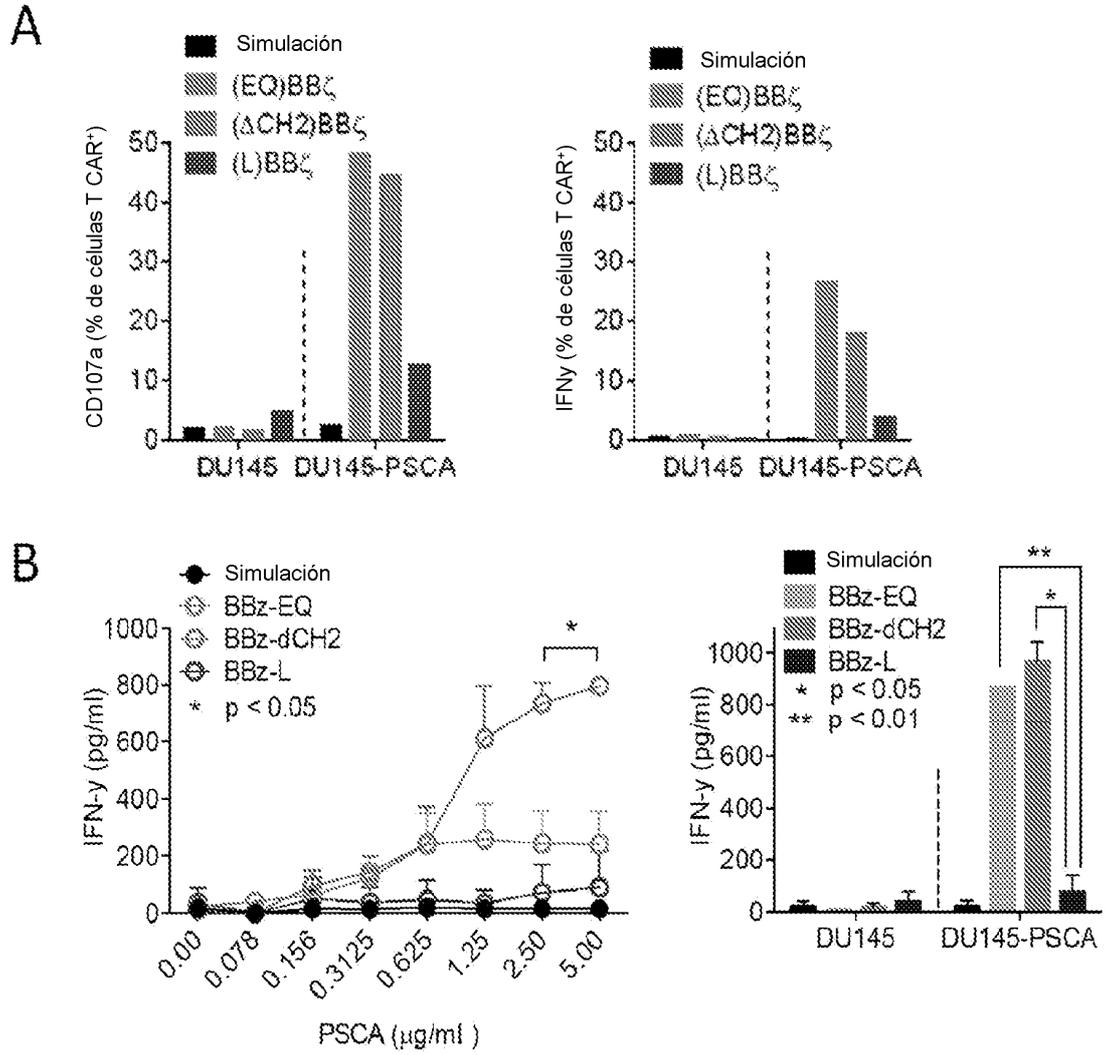


FIG. 5

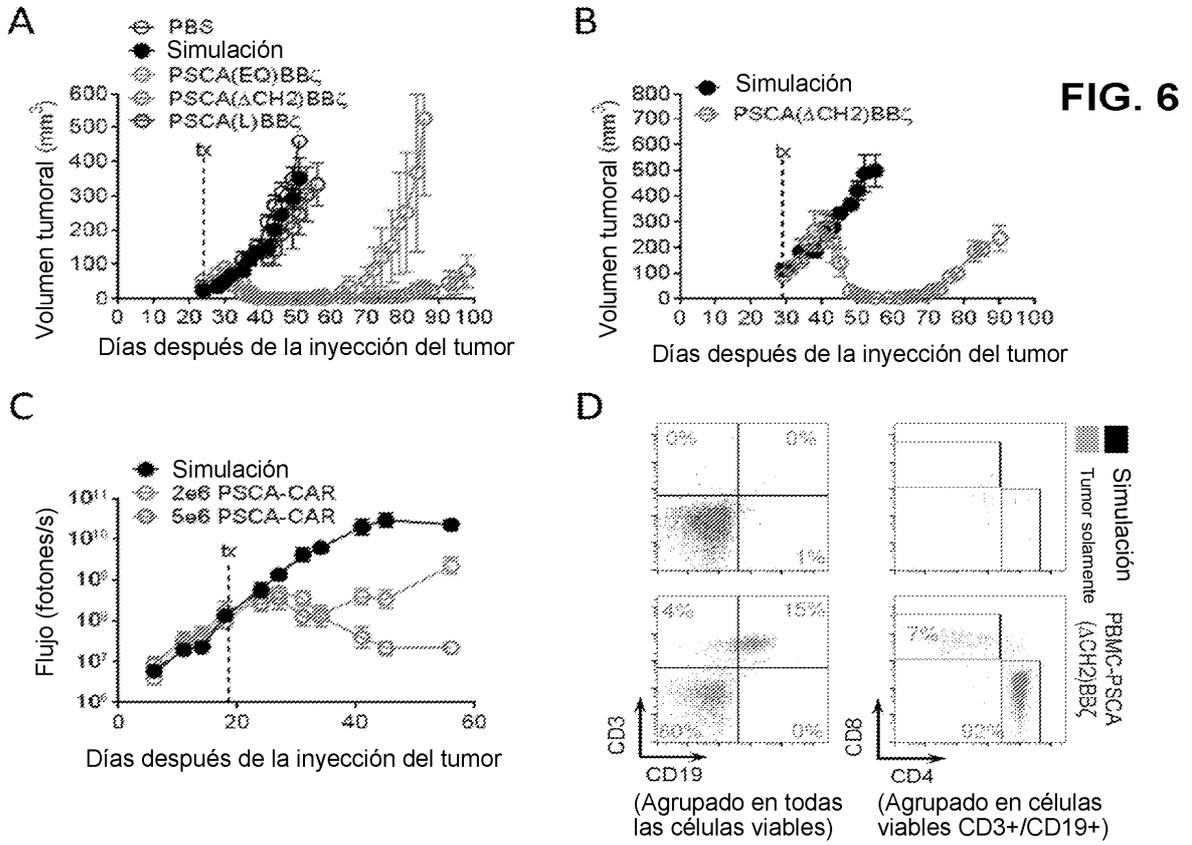


FIG. 6

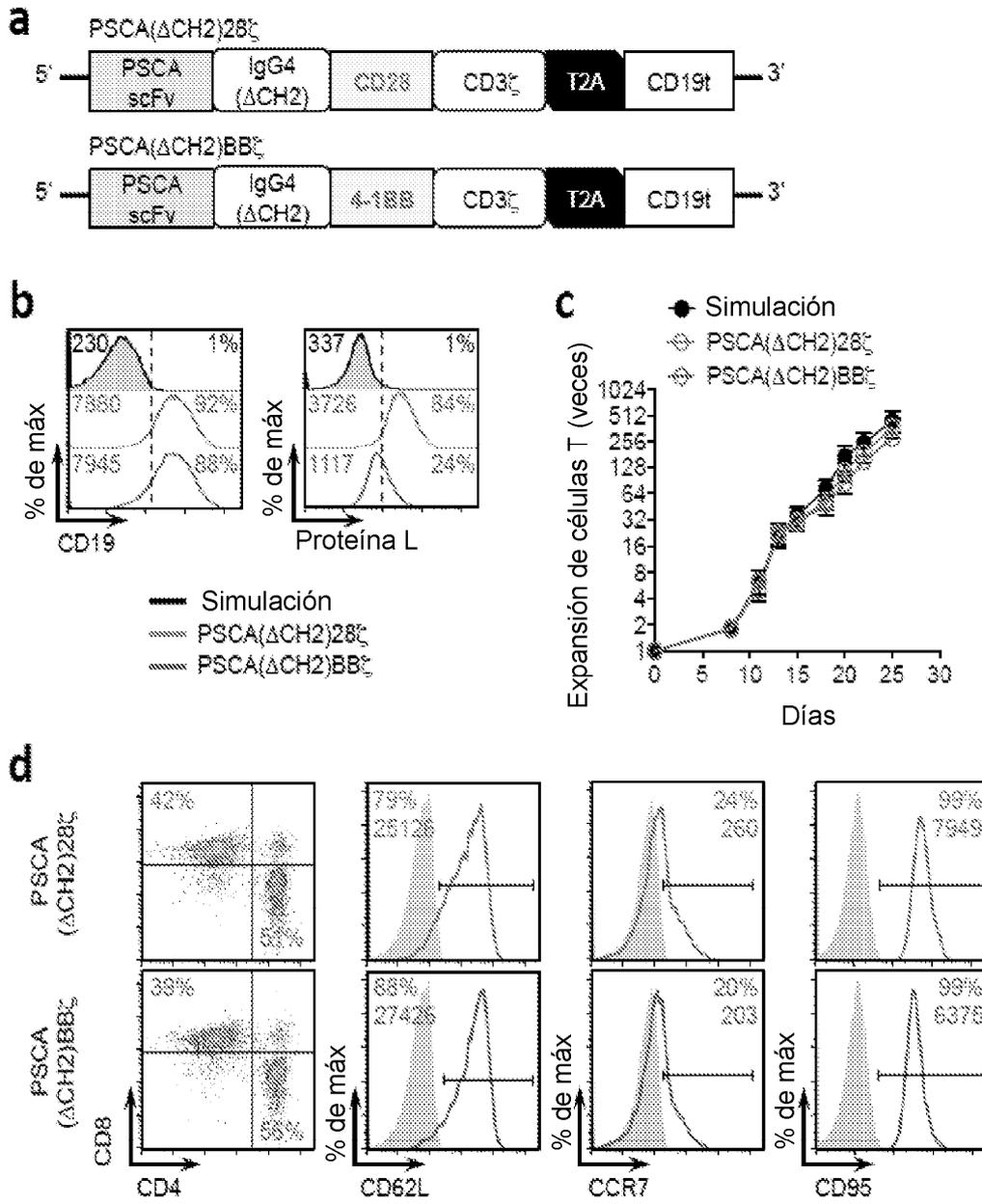


FIG. 7

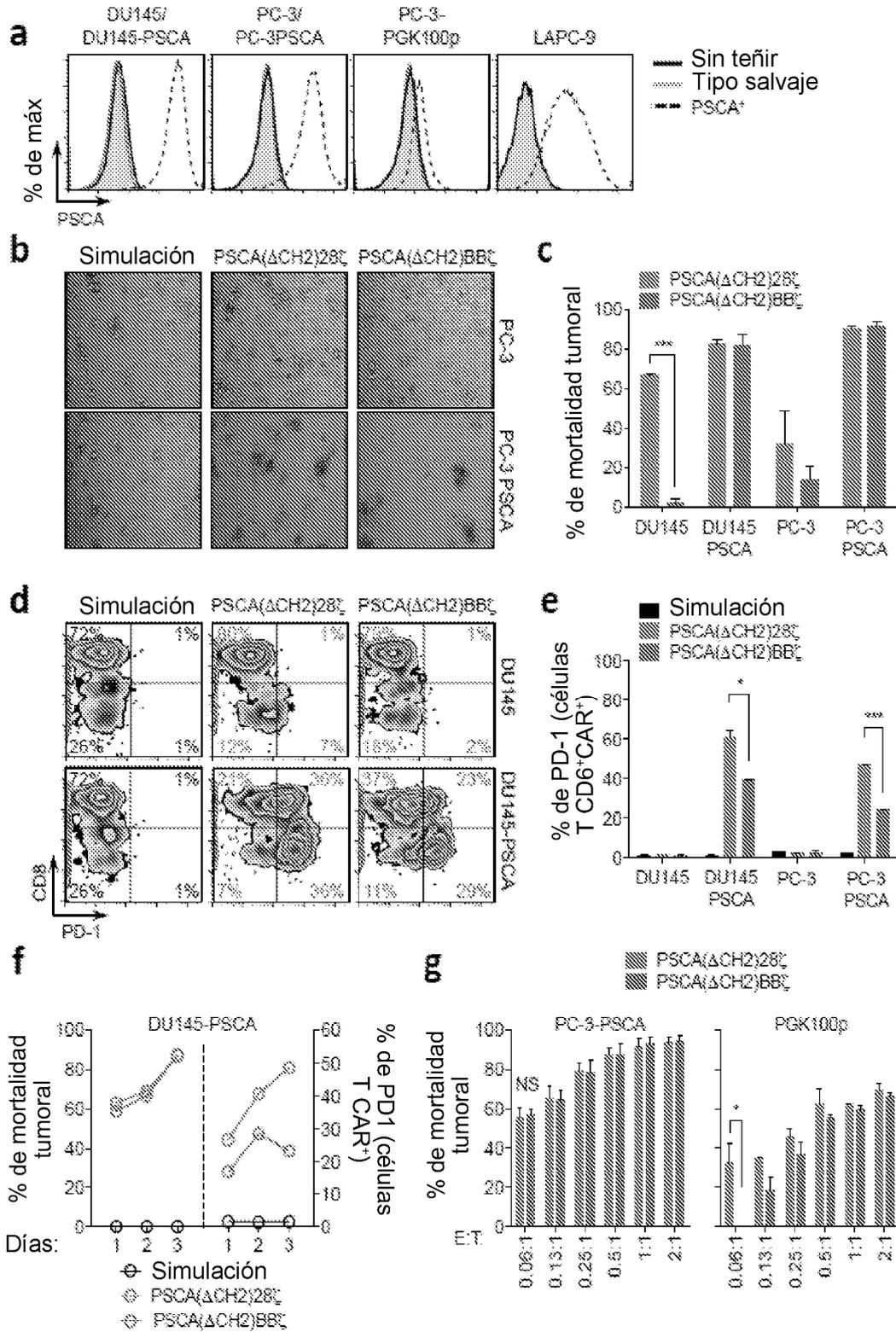


FIG. 8

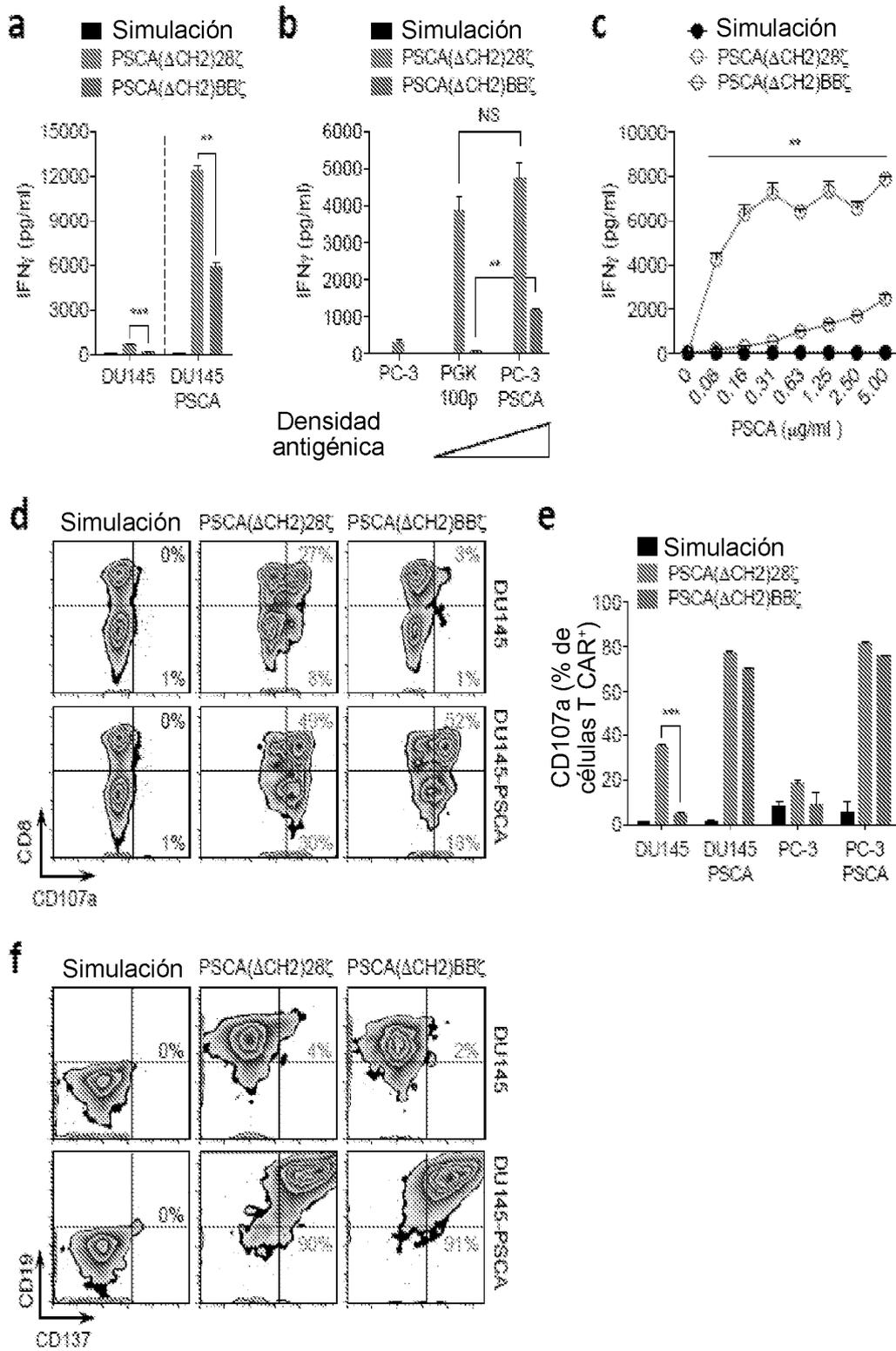


FIG. 9

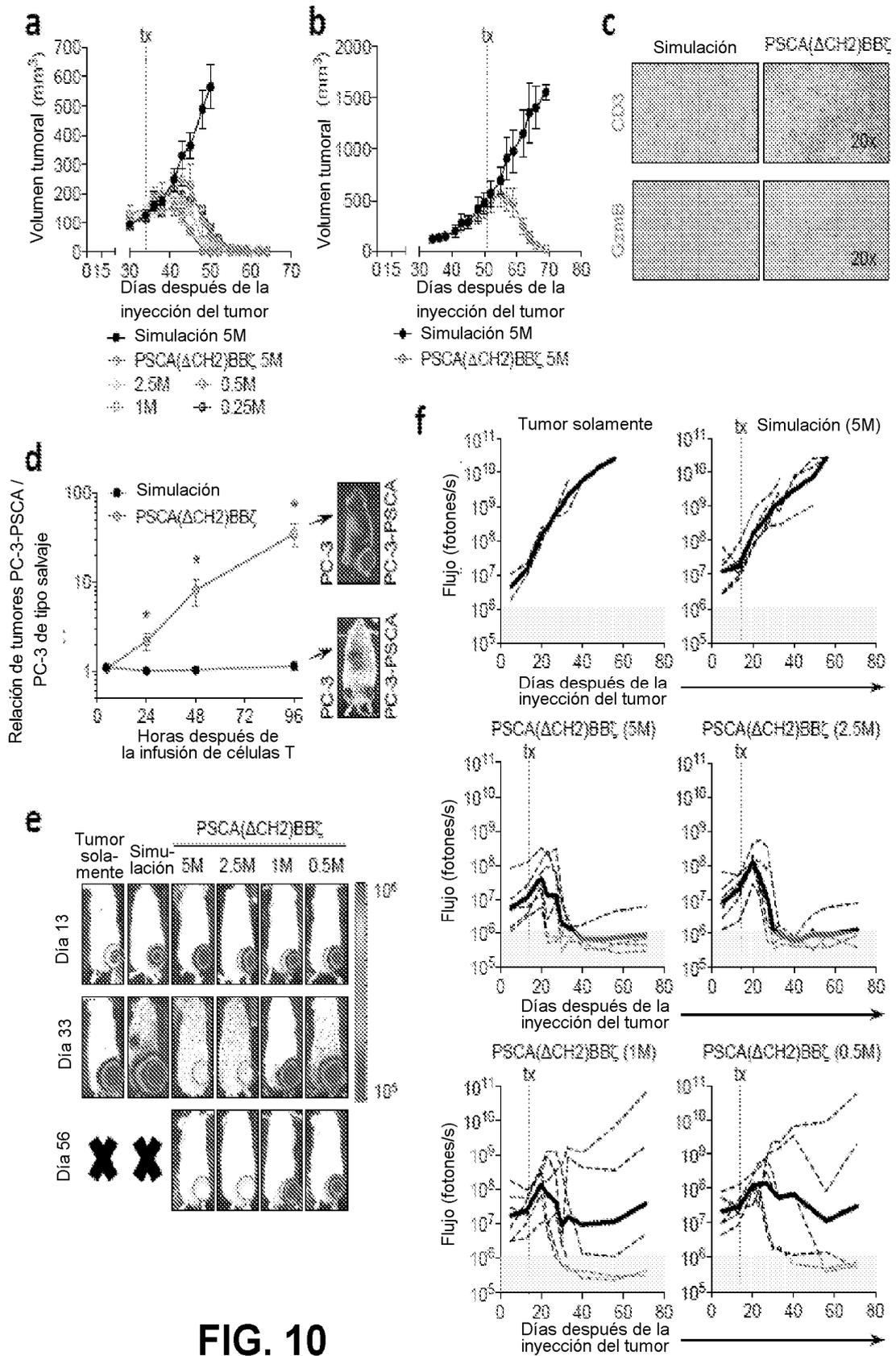


FIG. 10

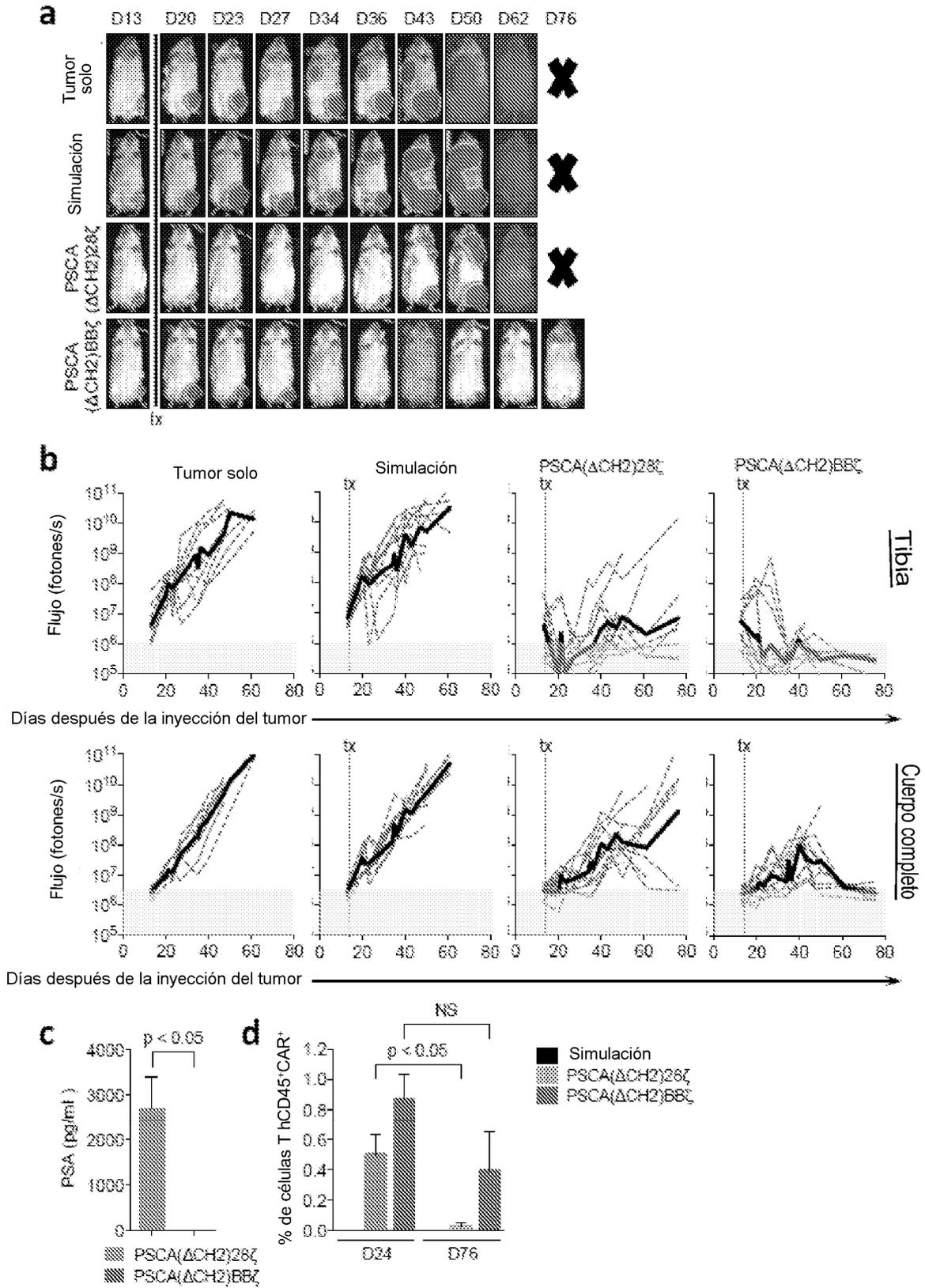


FIG. 11

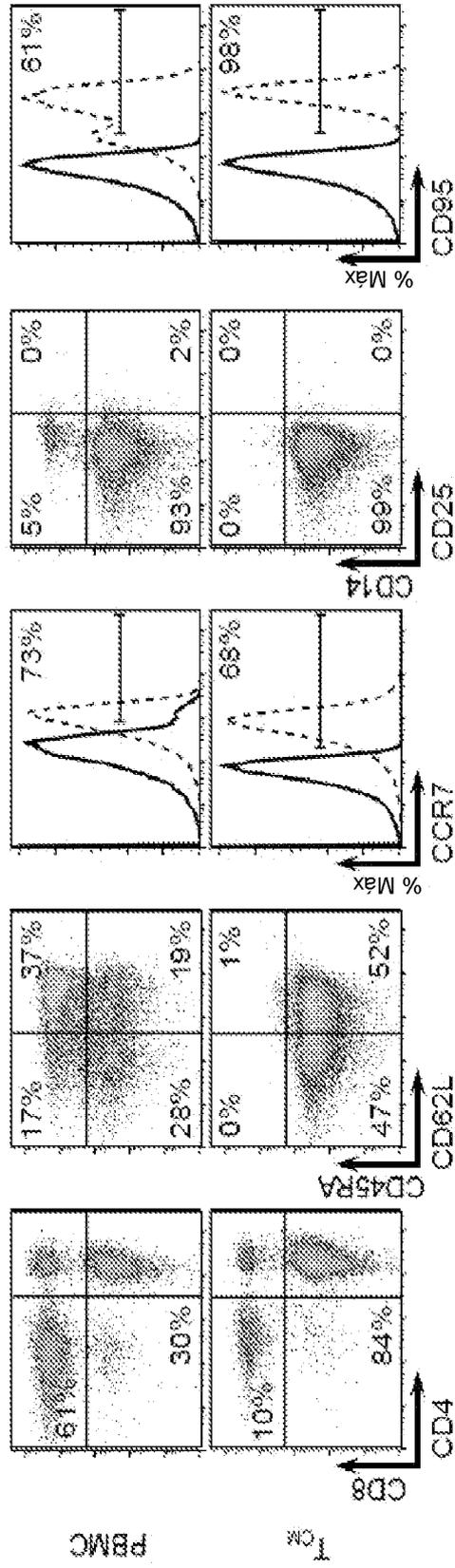


FIG. 12

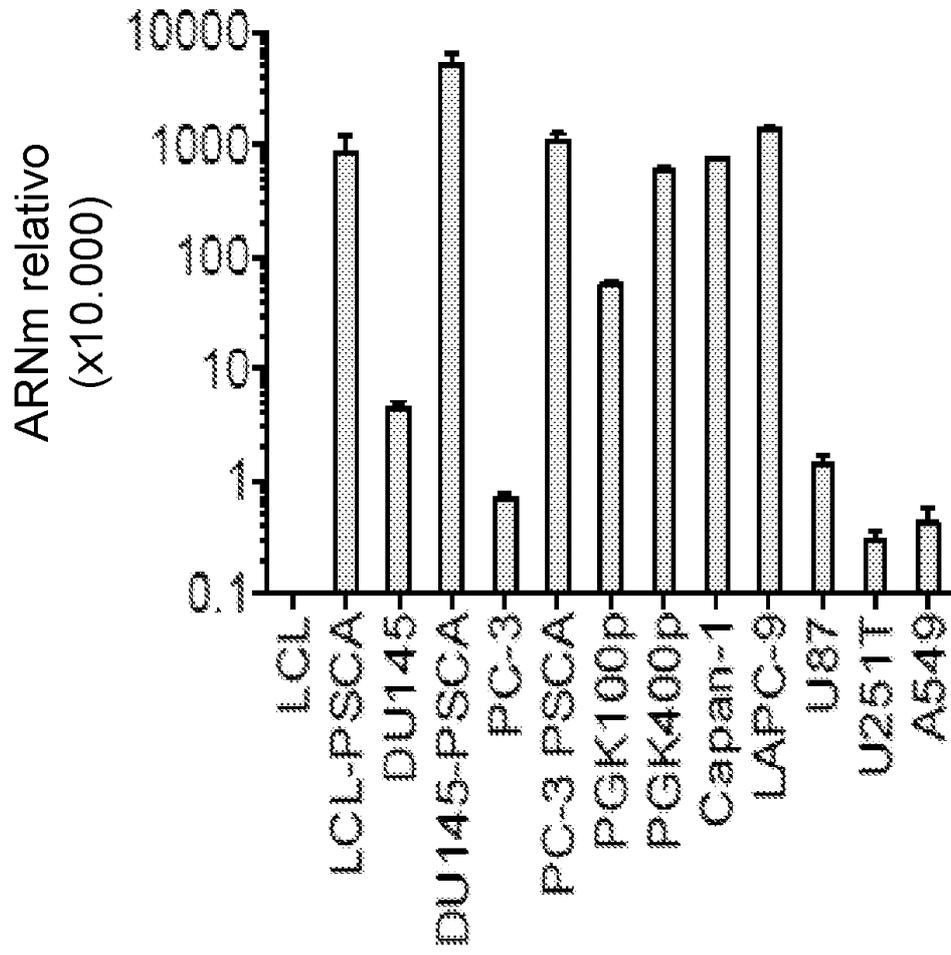


FIG. 13

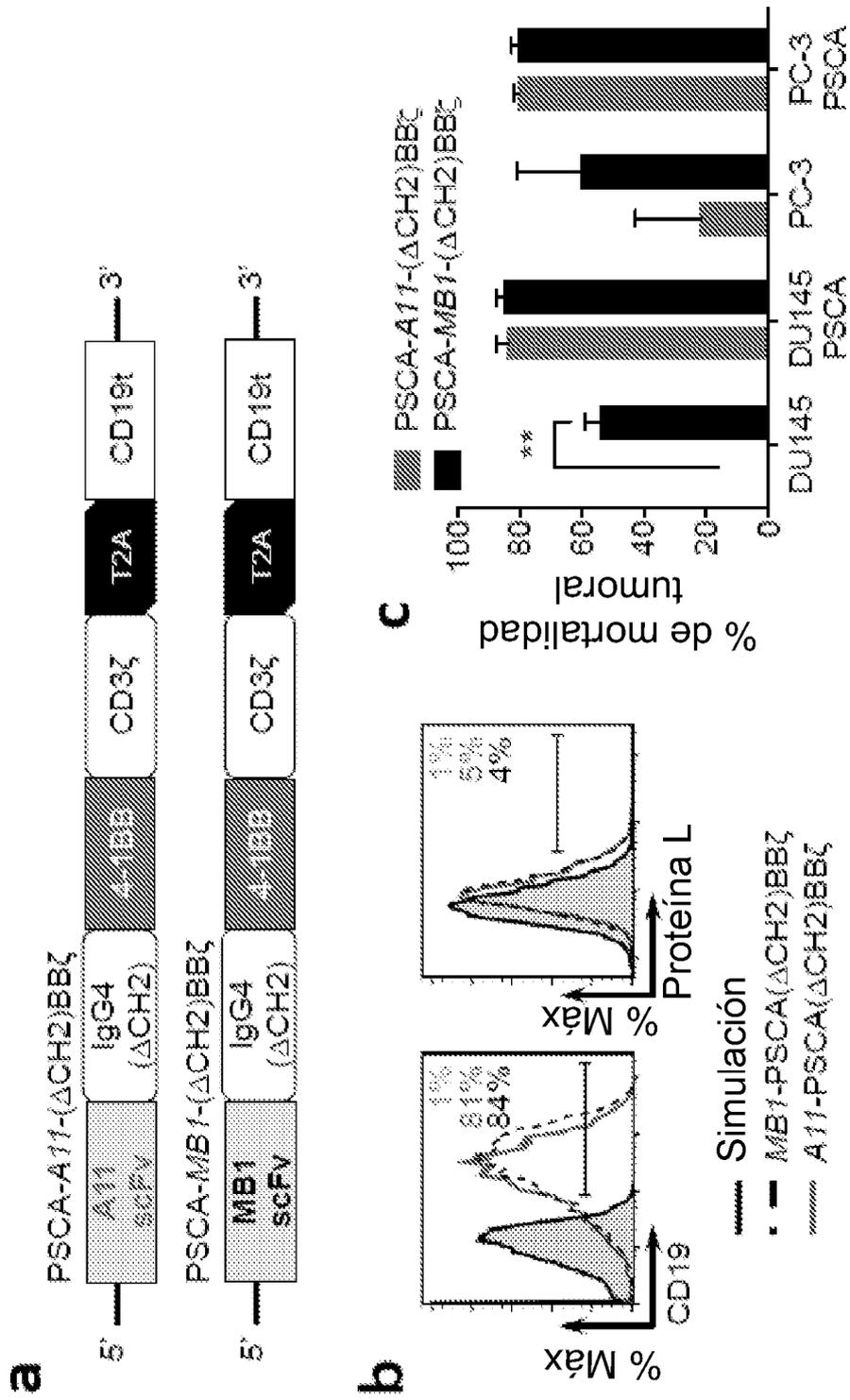


FIG. 14

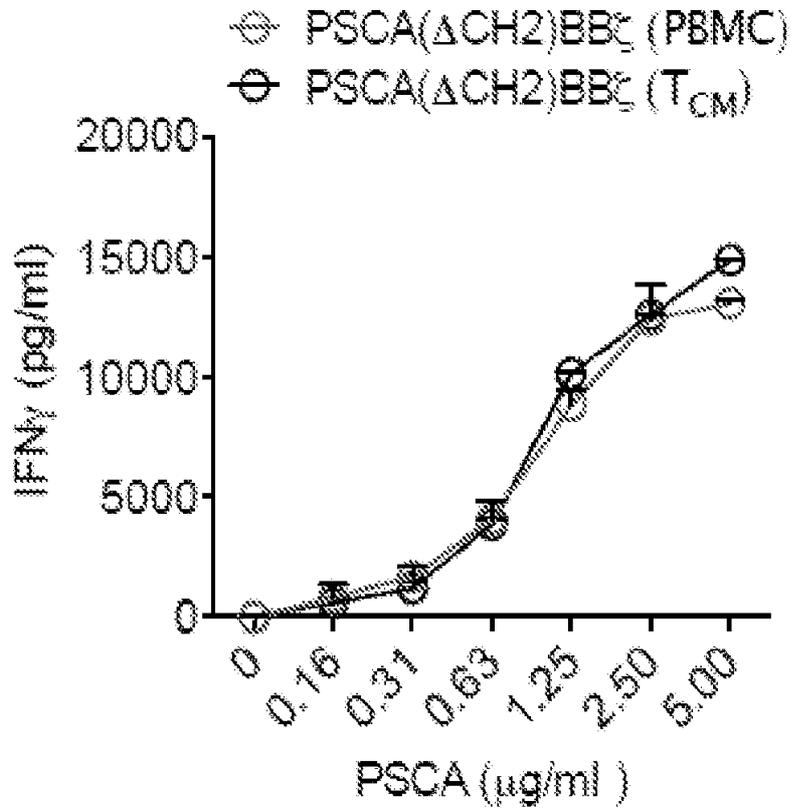


FIG. 15

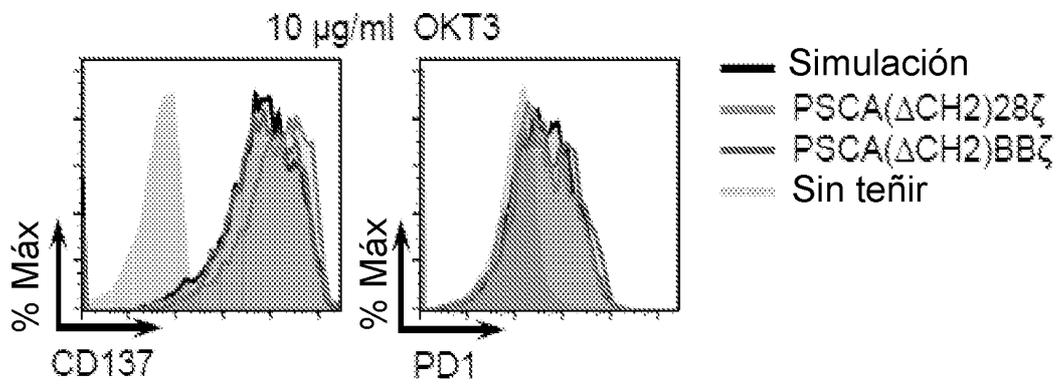


FIG. 16

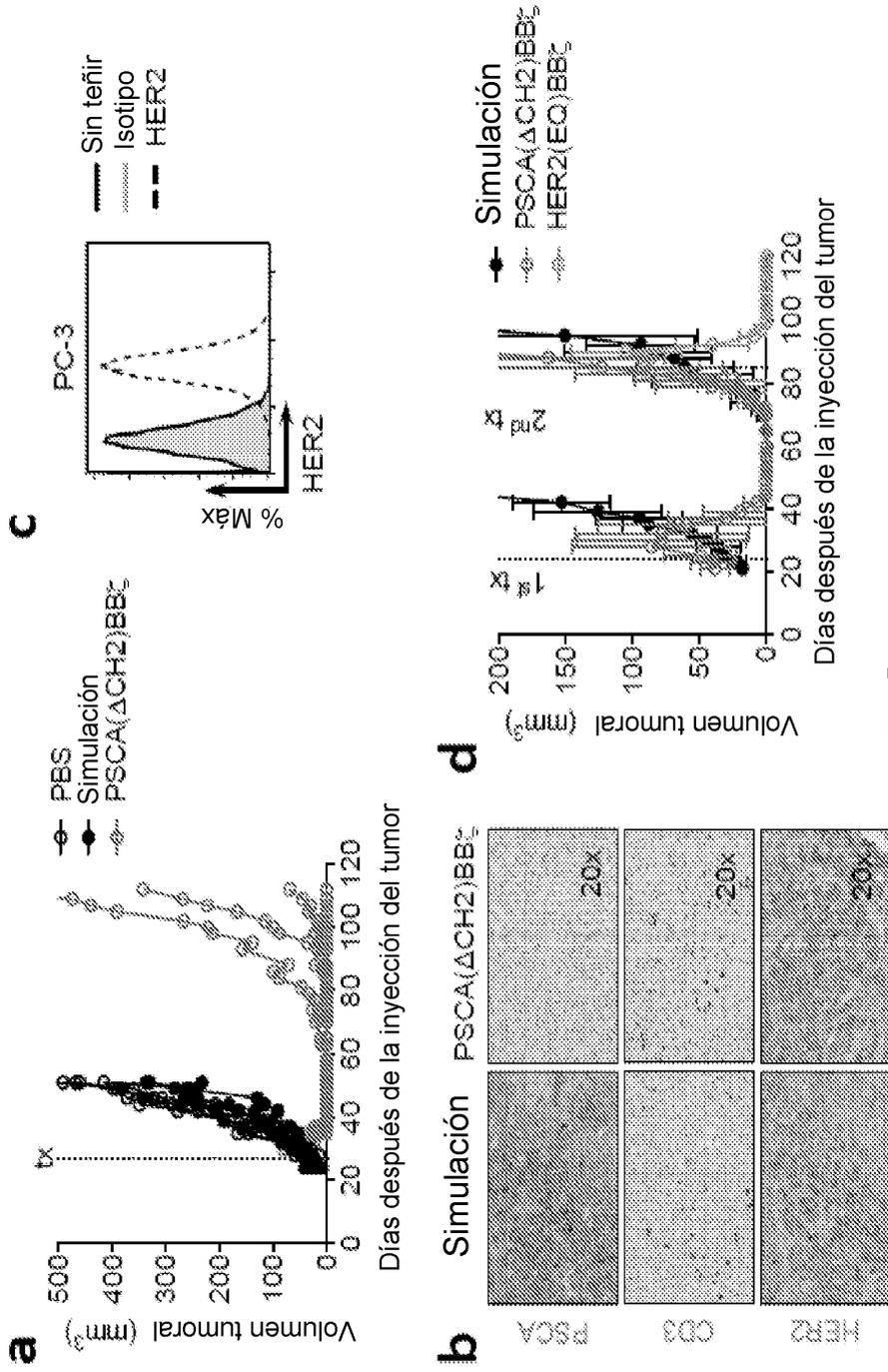


FIG. 17

PSCAscFv-IgG4(S228P,L235E,N297Q)-CD28tm-CD28gg-Zeta-T2A-CD19t

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQLTQSPSTLSASVGDRTTITCSASSVRFIHWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGTDFLTISSLQPEDFAT
Péptido señal GMCSFRa PSCAscFv

YYCQWGSPPFTFGQGTKVEIKGSTSGGGGGGGSEVQLVEYGGGLVQPGGSLRSLCAASGFNIKDYIHWVRQAPGKGLEWVAVWIDPENGD

TEFVPKFQGRATMSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCKTGGFWGQGLTVVSSESKYGPCCPAPAFEGGSPVFLFPKPKDITLMISRTPVTCVV
IgG4(S228P,L235E,N297Q)

VDVSOEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYVYTLPPSQEEMTKN

QVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYRSLTVLTKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLKGKMFVWVWVGGVLA
 CD28 tm

CYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSGGGGVKFSRSADAPAYQQGQNLNLYNELNIGRREEYDVLDKRR
 CD28cyto

GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELOKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
 Zeta

FIG. 19

PSCascFv-^{Enlazador}-CD4tm-41BB-Zeta

M L L L V T S L L L C E L P H P A F L L I P D I Q L T Q S P S T L S A S V G D R V T I T C S A S S V R F I H W Y Q Q K P G K A P K R L I Y D T S K L A S G V P S R F S G S G G T D F T L T I S S L Q P E D F A T

Péptido señal GMCSFRa PSCascFv

Y Y C Q Q W G S S P F T F G Q T K V E I K G S T S G G S G G S G G S S E V Q L V E Y G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N I K D Y Y I H W V R Q A P G K G L E W V A W I D P E N G D

T E F V P K F Q G R A T M S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C K T G G F W G Q G T L V T V S S G G S S G G S G M A L I V L G G V A G L L F I G L G I F F K R G R K K L L Y I F

Enlazador CD4 tm 4-1BB cyto

K Q P F M R P V Q I T T Q E E D G C S C R F P E E E E G G C E L G G G R V K F S R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R R F E Y D V L D K R R G R D P E M G G K P R R K N P

Zeta

Q E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G M K G E R R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A L P P R

FIG. 20

PSCAscFv-IgG4(HL-CH3)-CD28tm-CD28gg-Zeta

MLLLVTSLLLCELLPAPAFLLIPDIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCSASSVRFIHWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFAT

Péptido señal GMCsFRa PSCAscFv

YYCQQWGSPPFTFGQGTKVEIKGSTSGGGGGGGSSSEVQLVEYGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDYIHWVRQAPGKGLEWVAWIDPENGD

TEFVPKFQGRATMSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCKTGGFWGQGLTVVSSSESKYPPCPPCPGGGSSGGGQPREPQVYTYLPPSQEEMTK

IgG4(SmP)-H Enlazador IgG4-CH3

NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFELYRLTVDKSRWQEGNVFSCSMHEALHNHYTQKSLSLGLKMFVWLVVVG

CD28 tm

ACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSGGGRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREYDVLDKR

CD28cyto

Zeta

RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

FIG. 21

PSCAscFv-IgG4(S228P,L235E,N297Q)-CD4tm-41BB-Zeta

MILLVTSLLCELPHPAFLIPDIQLTQSPSTLSASVGDRTVITCSASSVRFIHWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLAGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFAT

Péptido señal GMCSFRa PSCAscFv

YYCQWGSPTFGQTKVEIKGSTSGGGGGGSEVQLVEYGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDYIHWVROAPGKGLEWVAWIDPENGD

TEFVPKFQGRATMSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCKTGGFWGQGLTVSSESKYGPPCPPCPAPEEEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV

IgG4(S228P,L235E,N297Q)

VDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYVYVLPSSQEEEMTKN

QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGMALIVLGGVAGLLI

CD4 tm

FIGLGIFFKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCRCRPEEEEGGCELGGRVKFSRSADAPAYQQGNOLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDRPEMGG

4-1BB cyto

Zeta

KPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKERRRGKGDGLYQGLSTATKTDYDALHMQALPPR

FIG. 22

PSCAscFv - Enlazador - CD28tm - CD28gg - Zeta

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQLTQSPSTLSASVGDRTVITCSASSVRFIHWWYQQPKGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFGSGSGTDFTLTSSLQPEDFAT

Péptido señal GMCSFRa PSCAscFv

YYCQQWSSPFTFGQGTKVEIKGSTSGGGGGGGSSSEVQLVEYGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDYIHWVVRQAPGKGLEWVAVWIDPENGD

TEFVPKFQGRATMSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCKTGGFWGQGLTVTVSSGGSSGGSGMFWLVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKRS

Enlazador CD28 tm CD28^{cvtio}

RGHSDYMNMTPRRPGPIRKHYPYAPPRDFAAYRSGGGGRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE

Zeta

GLYNEQLQDKMAEAYSEIGMIKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

FIG. 23