

CUESTA & ASOCIADOS, ABOGADOS
Calle 72 # 10 – 07, Of. 603
Tel.: 2113097
www.cuestalawyers.com
Bogotá, D.C., Colombia
COMPLEMENTO DE INFORMACIÓN
Exp. 13-137536



1

Señor Jefe
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
E. S.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-137536-00001-0000

Fecha: 2013-07-10 13:22:03 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 261 262

Referencia: Expediente: 13-137536
Solicitante: THE TRUSTEES OF THE
UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA
Patente: PCT/ FASE NACIONAL
Asunto: Complemento de Información,
traducciones

COMPLEMENTO DE INFORMACIÓN

JUAN CARLOS CUESTA QUINTERO, mayor de edad, abogado en ejercicio, portador de la cédula de ciudadanía No. 79.339.809 de Bogotá y de la Tarjeta Profesional No. 43.273 expedida por el Consejo Superior de la Judicatura, actuando como apoderado de la sociedad THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA, dentro de la solicitud de patente de la referencia, me permito adjuntar lo siguiente:

1. Traducción al Español de los documentos que hacen parte de la Patente con extensión Territorial a Colombia, enmarcada en la referencia y bajo el número de registro citado, la cual consta de ____ folios.

No siendo más el motivo de la presente, se suscribe,

De la señora Jefe,


JUAN CARLOS CUESTA Q.
C.C. 79.339.809 de Bogotá
T.P. 43.273 del C.S.J.

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional 14 de Junio de 2012 (14.06.2012)

(10) Numero de Publicación Internacional **WO 2012/079000 A1**

WIPO | PCT

(51) Clasificación Internacional de Patente:

CO7H 21/04 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/US2011/064191

(22) Fecha de Radicación Internacional: 9 de Diciembre de 2011 (09.12.2011)

(25) Idioma de Radicación: Inglés

(26) Idioma de publicación: Inglés

(30) Fecha de Prioridad:

61/421,470

9 de Diciembre de 2010 (09.12.2010) US

61/502,649

29 de Junio de 2011 (29.06.2011)

(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto los Estados Unidos): THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (US/US); Center For Technology Transfer, 3160 Chestnut Street, Suite 200, Philadelphia PA 19104-6283 (US).

(72) Inventores; y

(75) Inventores solicitantes (para Estados Unidos unicamente); JUNE, Carl, H. (US/US); 409 Baird Road, Merion Station, PA 19066 (US) LEVINE, Bruce, L. (US/US); 1258 Liberty Bell Drive, Cherry Hill, NJ 08003 (US). PORTER, David, L. (US/US), 821 Crum Creek Road, Springfield, PA 19064 (US). KALOS, Michael, D. (US/US); 716 Carpenter Lane Philadelphia, PA 19119 (US).

(74) Agentes: NGUYEN. Quang, D. et al.: Riverside Law, LLP. 300 Four Falls Corporate Center Suite 710, 300 Conshohocken State Road, West Conshohocken, PA 19428 (US).

(81) Estados designados (a menos que se indique un procedimiento distinto, para cada tipo de protección nacional disponible se aplica lo siguiente): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (a menos que se indique un procedimiento distinto, para cada tipo de protección nacional disponible se aplica lo siguiente) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZA, ZW),

9

Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) Europa (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- Con informe de investigación internacional (Artículo 21 (3))
- Antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y publicarse nuevamente en el evento de recibir las modificaciones (Regla 48 2(h)).
- Con la parte de descripción sobre listados de secuencia (Regla 5.2 (a)).

TITULO DEL INVENTO**USO DE CELULAS T MODIFICADAS POR RECEPTOR DE ANTIGENO****QUIMERICO PARA EL TRATAMIENTO DE CANCER****REFERENCIA TRANSVERSAL CON LA SOLICITUD RELACIONADA**

Esta solicitud reivindica prioridad sobre la Solicitud Provisional U.S. No. 61/421,470, radicada en Diciembre 9 de 2010, y la Solicitud Provisional U.S. No. 61/502,649, radicada en Junio 29 de 2011, todas las cuales se incorporan al presente instrumento a manera de referencia en forma total.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

La gran mayoría de pacientes con condiciones malignas de las células B, incluso la leucemia linfocítica crónica (CLL), fallecen a causa de su patología.

Un enfoque para el tratamiento de estos pacientes consiste en modificar genéticamente las células T para apuntarle a los antígenos expresados en células tumorales mediante la expresión de receptores antígenos quiméricos (CARs). Estos CARs son receptores antígenos diseñados para reconocer antígenos de superficies celulares en forma de leucocitos humanos independientes del antígeno. Se han realizado intentos para utilizar células genéticamente modificadas que expresen CARs para el tratamiento de estos tipos de pacientes pero el éxito ha sido muy limitado. Consultar por ejemplo, Brentjens et al., 2010,

6

Molecular Therapy, 18:4, 666-668; Morgan et al., 2010, Molecular Therapy, published online February 23, 2010, pages 1-9; y Till et al., 2008, Blood, 112:2261-2271.

En la mayoría de los cánceres, los antígenos específicos tumorales no se encuentran todavía bien definidos, sin embargo para el caso de condiciones malignas de células B, el CD19 es un objetivo interesante para los tumores. La expresión para el CD19 se restringe a células normales y malignas B (Uckun, et al. Blood, 1988, 71:13-29, de tal manera que CD19 es un objetivo ampliamente aceptado para probar de manera segura los CARs. Si bien los CARs pueden desencadenar la activación de células T de manera similar a un receptor endógeno de células T, un gran impedimento a la aplicación clínica de esta tecnología a la fecha se ha limitado en la expansión in vivo de las células CAR + T, con una rápida desaparición de las células después de la infusión, y una actividad clínica frustrante (Jena, et al., Blood, 2010, 116:1035-1044; Uckun, et al. Blood, 1988, 71:13-29).

En este orden de ideas, existe una urgente necesidad en la técnica para lograr composiciones y métodos de tratamiento del cáncer utilizando los CARs que puedan expandirse in vivo. El presente invento aborda esta necesidad.

RESUMEN DEL INVENTO

El presente invento brinda una secuencia aislada del ácido nucleico que codifica un receptor antígeno quimérico (CAR), en donde dicho CAR comprende un dominio de aglutinación de antígeno, un dominio de trans-membrana, una región de señalización co-estimuladora, y un dominio de señalización CD3 zeta, en donde el dominio de señalización CD3 zeta comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID No.: 24.

En una presentación, la secuencia del ácido nucleico codifica un CAR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.: 12

En una presentación, la secuencia del ácido nucleico que codifica un CAR comprende la secuencia del ácido nucleico del SEQ ID No.: 8.

En una presentación, el dominio de unión del antígeno en el CAR es un anticuerpo o bien un fragmento de unión del antígeno para el mismo. Preferiblemente, el fragmento de unión del antígeno es un Fab o un scFv.

En una presentación, el dominio de unión del antígeno en el CAR se une a un antígeno tumoral. En una presentación, el antígeno tumoral se asocia con una condición maligna hematológica. En otra presentación, el antígeno tumoral se asocia con un tumor sólido. Otra presentación además, muestra el antígeno tumoral seleccionado a partir del grupo conformado por CD19, CD20, CD22,

ROR1, mesotelin, CD33/ILRa, c-Met, PSMA, Glicolípido F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR y cualquiera de sus combinaciones.

En una presentación, la región de señalización co-estimuladora en el CAR comprende el dominio intracelular de una molécula co-estimuladora seleccionada a partir del grupo conformado por CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, 1COS, antígeno asociado a la función de linfocitos -1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83, y cualquiera de sus combinaciones.

En una presentación, el dominio de señalización CD3 zeta en el CAR se codifica por medio de la secuencia del ácido nucleico del SEQ ID No.: 18

El invento también proporciona un CAR aislado que comprende un dominio de unión de antígeno, un dominio de trans-membrana, una región de señalización co-estimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta, en donde el dominio de señalización CD3 zeta comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.: 24.

El invento además proporciona una célula que comprende una secuencia del ácido nucleico que codifica un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión de antígeno, un dominio de trans-membrana, una región de señalización co-

estimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.: 24.

En una presentación, la célula comprende el CAR y se selecciona a partir del grupo conformado por una célula T, una célula de Eliminación Natural (NK), un linfocito cito tóxico T (CTL) y una célula reguladora T.

En una presentación, la célula comprende el CAR y muestra una inmunidad antitumoral cuando el dominio de unión de antígeno del CAR se une a su antígeno correspondiente.

El invento además proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión de antígeno, una región de señalización co-estimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta, en donde el dominio de señalización CD3 zeta comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No.: 24.

El invento además proporciona un método para estimular una respuesta inmune mediada por las células T para una población de células objetivo o tejido en un mamífero. En una presentación, el método comprende la administración a un mamífero en una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un CAR en donde dicho car comprende un dominio de unión de antígeno, una región de señalización co-estimuladora, y un dominio de

señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.: 24, en donde el dominio de unión del antígeno se selecciona para reconocer específicamente la población de células objetivo o los tejidos.

El invento además brinda un método para suministrar una inmunidad anti-tumoral en un mamífero. En una presentación, el método comprende la administración a un mamífero de una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un CAR en donde el CAR comprende un dominio de unión de antígeno, una región de señalización co-estimuladora y un dominio de señalización que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.: 24, proporcionando de esta manera una inmunidad antitumoral en el mamífero.

El invento incluye además un método para el tratamiento de un mamífero que tenga alguna patología, trastorno o condición que se asocie con una expresión elevada de un antígeno tumoral. En una presentación, el método comprende la administración a un mamífero de una cantidad eficaz de una célula genéticamente modificada para expresar un CAR en donde dicho CAR comprende un dominio de unión de antígeno, una región de señalización co-estimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.: 24, tratando de esta manera al mamífero.

En una presentación, la célula es del tipo autóloga T.

En una presentación, el antígeno tumoral se selecciona a partir del grupo conformado por CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelin, CD33/ILRa, c-Met, PSMA, Glicolípido F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR y cualquiera de sus combinaciones.

El invento además brinda un método para el tratamiento de un humano que padezca leucemia linfocítica crónica. En una presentación, el método comprende la administración a un humano de una celular T modificada genéticamente para expresar un CAR en donde el CAR comprende un dominio de unión de antígeno, una región de señalización co-estimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.: 24.

En una presentación, el humano es resistente a por lo menos un agente quimioterapéutico.

En una presentación, la leucemia linfocítica crónica es del tipo refractario CD19+ leucemia y linfoma.

El invento también incluye un método para generar una población persistente de células genéticamente modificadas del tipo T en un humano que tenga diagnóstico de cáncer. En una presentación, el método comprende la administración a un humano de una célula T genéticamente modificada para expresar un CAR en donde el CAR comprende un dominio de unión de antígeno,

una región de señalización co-estimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.: 24, en donde la población persistente de las células T genéticamente modificadas persiste en el humano durante un mes como mínimo después de la administración.

En una presentación, la población persistente de células T genéticamente modificadas comprende como mínimo una célula seleccionada a partir del grupo conformado por una célula T que se administro a un humano, una progenie de células T que se administro al humano y una combinación de las anteriores.

En una presentación, la población persistente de células T genéticamente modificadas comprende una célula T de memoria.

En una presentación, la población persistente de células T genéticamente modificadas persiste en el humano como mínimo en tres meses después de la administración. En otra presentación, la población persistente de células T genéticamente modificadas persiste en el humano por 4 meses como mínimo, o cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce meses, dos años o tres años después de la administración.

En una presentación, se trata la leucemia linfocítica crónica.

El invento brinda además un método para expandir una población de células T genéticamente modificadas en un humano diagnosticado con cáncer. En una presentación, el método comprende la administración en un humano de una célula T genéticamente modificada para expresar un CAR en donde este último comprende un dominio de unión de antígeno, una región de señalización co-estimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.: 24 en donde la célula T genéticamente modificada que se administra produce una población de células T de progenie en el humano.

En una presentación, las células T de progenie en el humano comprenden una célula T de memoria.

En una presentación, la célula T es del tipo célula autóloga T.

En otra presentación, el humano es resistente por lo menos a un agente quimioterapéutico.

En una presentación, el cáncer es una leucemia linfocítica crónica. En otra presentación, la leucemia linfocítica crónica es del tipo refractaria CD19+ leucemia y linfoma.

En una presentación, la población de células T de progenie persiste en el humano como mínimo durante tres meses después de la administración. En otra presentación, la población de células T de progenie persiste en el humano como

minino durante cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce meses, dos años o tres años después de la administración.

En una presentación, se somete el cáncer a tratamiento.

DESCRIPCION BREVE DE LOS DIBUJOS

La siguiente descripción detallada de presentaciones preferidas del invento se comprenderá mejor si se lee en conjunto con los dibujos adjuntos. Con el fin de ilustrar el invento, aparecen en los dibujos presentaciones que actualmente son preferenciales. Deberá entenderse de todas maneras que el invento no se limita a las disposiciones e instrumentalidades precisas de las presentaciones que aparecen en los dibujos.

La Figura 1, que comprende las Figuras 1A hasta 1C, es una serie de imágenes de las representaciones esquemáticas del vector de transferencia genética y del transgene, de la celular T modificada genéticamente y del diseño del protocolo clínico. La Figura 1A muestra los vectores lentivirales y los transgenes que muestran los elementos funcionales principales. Se produjo un vector lentiviral de grado clínico pseudo-tipeado de proteína G correspondiente al virus de estomatitis vesicular (designado como pELPs 19BBz) que dirige la expresión de anti-CD19 scFv que se deriva a partir del anticuerpo monoclonal FMC63 murine, de la unión CD8 α humana y del dominio de trans-membrana, además de dominios humanos

4-1BB y de señalización CD3 zeta. La expresión constitutiva del transgene se dirigió mediante inclusión de una EF-1 α (factor de elongación -1 α promotor); LTR, repetición terminal larga; RRE, elemento de respuesta rev, (cPPT) y secuencia de terminación central (CTS). La Figura no está hecha a escala. La Figura 1B muestra la elaboración de la célula T. Se obtuvieron las células autólogas vía aféresis, y las células T fueron enriquecidas por elutriación celular mono nuclear, y las células de leucemia lavadas y residuales fueron agotadas por adición de beads paramagnéticas recubiertas con anti-CD3/CD28 para la selección positiva y activación de las células T. Se adiciono el vector lentiviral en el momento de activación celular y luego se lavo el día 3 posterior a la iniciación del cultivo. Las células fueron expandidas en un dispositivo de plataforma oscilante (WAVE Cioreactor System) durante 8 – 12 días. El día final del cultivo se retiraron las esferas pasándolas por un campo magnético y se cultivaron las células CART19 T y luego fueron crio preservadas en un medio infusible. La Figura 1C muestra el diseño de protocolo clínico. A los pacientes se les aplico quimioterapia linfoprogrediente según se describió, seguida de infusión CART19 #1 por goteo de flujo por gravedad intravenosa en un periodo de 15 – 20 minutos. La infusión se aplico utilizando una dosis dividida durante 3 días (10%, 30%, 60%) a partir de 1 a 5 días después de finalizar la quimioterapia. Se hicieron estudios de punto final en la semana de estudio numero 4. Al finalizar el monitoreo activo, los sujetos fueron transferidos a un protocolo de destino para realizar un seguimiento de largo plazo de acuerdo con la guía FDA.

La Figura 2 comprende Figuras 2A hasta 2F, y es una serie de imágenes que demuestran expansión sustancial in vivo y persistencia en sangre y medula de las células CART19. El ADN se aisló a partir de la sangre entera como se aprecia en las Figuras 2A hasta 2C o de medula como se demuestra en las Figuras 2D hasta 2F, luego se obtuvieron muestras de UPN 01 como se aprecia en las Figuras 2A y 2D, UPN 02 como se aprecia en la Figura 2B y 2E y UPN 03 como se aprecia en la Figura 2C y 2F, sometiéndose en general al análisis Q-PCR utilizando un ensayo calificado para detectar y cuantificar la secuencia CART19. Cada uno de los puntos de datos representa el promedio de mediciones por triplicado en un ADN genómico 100 – 200 ng, con niveles máximos %CV menores a 1.56%. Los parámetros de supera/no supera para el ensayo incluyeron rangos pre-establecidos para inclinación y eficiencia de amplificación y amplificación de una muestra de referencia. El límite inferior de cuantificación para el ensayo establecido por la curva estándar fue de 2 copias de transgene/ADN genómico microgramos; los valores de muestra por debajo de dicho numero se consideran como estimativos y se presentan si por lo menos 2/3 de replicados generaron un valor Ct con % CV para los valores 15%. Las células CART19 fueron infundidas en los días 0, 1 y 2 para UPN 01 y UPN 03 y los días 0, 1, 2 y 11 para UPN 02.

La Figura 3 comprende las Figuras 3A hasta 3D y son una serie de imágenes que demuestran las citoquinas de suero y medula ósea antes y después de la infusión celular CAR T; mediciones longitudinales de cambios en citoquinas del suero, quimoquinas y receptores de citoquina en UPN 01 como se aprecia en la Figura

17

3A, UPN 02 como se aprecia en la Figura 3B y UPN 03 como se aprecia en la Figura 3C, el día señalado después de la infusión celular CART19 y evaluaciones seriales de los mismos analitos en la medula o sea a partir de UPN 03 como se muestra en la Figura 3D. Las muestras fueron sometidas al análisis multiplex utilizando tecnología de distribución de esferas Luminex y kits multiplex ensamblados y validados. Los analitos con cambios de A $\geq$ 3 veces se indican y grafican como un cambio relativo a partir de la línea basal como se muestra en las Figuras 3A hasta 3C o como valores absolutos como se muestra en la Figura 3D. Los valores absolutos para cada analito en cada punto del tiempo se derivaron a partir de una curva estándar basada en proteína recombinante en una serie de diluciones de 8 puntos y 3 veces, con límites superiores e inferiores de cuantificación (ULOQ, LLOQ) determinados por los valores de corte observados/esperados de 80 – 120% para las curvas estándar. Cada muestra fue evaluada en duplicado con valores promedio calculados y % CV en la mayoría de los casos inferior al 10%. Para manejar la presentación de datos consolidados dentro del contexto de la amplia gama para valores absolutos, los datos se presentan como cambios con respecto de la valoración de línea basal para cada analito. En los casos en los que no se pudieron detectar valores de línea basal, la mitad del valor de curva estándar inferior se utilizó como valor de línea basal. Los rangos de curva estándar para los analitos y los valores de línea basal (día 0) (listados entre paréntesis en forma secuencial para UPN 01, 02 y 03), todos en pg/ml: ILI-R α : 35.5-29,318 (689, 301, 287); IL-6: 2.7-4, 572 (7, 10.1, 8.7); IFN- γ : 11.2-23,972 (2.8, ND, 4.2); CXCL10: 2.1-5, 319 (481, 115, 287); MIP-1 β : 3.3-7,233

(99.7, 371, 174); MCP-1; 4.8-3,600 (403, 560, 828); CXCL9: 48.2-3,700 (1,412, 126, 177); IL2-R α : 13.4-34,210 (4,319, 9,477, 610); IL-8: 2.4-5, 278 (15.3, 14.5, 14.6); IL-10: 6.7-13,874 (8.5, 5.4, 0.7); MIP-1 α : 7.1-13,778 (57.6, 57.3, 48.1).

La figura 4, que comprende Figuras 4A hasta 4D, es una serie de imágenes que muestran expresión prolongada de superficie CART19 y establecimiento de CARs in vivo para memoria funcional. La Figura 4A muestra detección de CAR que expresa CD3⁺ linfocitos y ausencia de células B en periferia y medula. La sangre periférica recientemente procesada o las células mononucleares de medula obtenidas a partir de UPN 03 el día 169 post-infusión celular CART19 se evaluaron mediante citometría de flujo para lograr la expresión de superficie de CAR19 (superior) o presencia de células B (inferior); a manera de control, el PBMC obtenido a partir de un donante saludable ND365 se pigmentó. La estrategia de división para CD3⁺ y poblaciones celulares B se presenta en la Figura 9. Para evaluar la expresión CAR19 en linfocitos CD3⁺, las muestras se co-pigmentaron con anticuerpos para CD14-PE-C y 7 y CD16-PE-Cy7 canal de volteo) y CD3-FITC, con divisiones positivas en CD3⁺, y luego se hizo una evaluación para la expresión CAR19 en los compartimentos de linfocitos CD8⁺ y CD8⁻ mediante co-pigmentación con CD8a-PE y anticuerpos idiotipos anti-CAR19 conjugados para formar Alexa-647. Los datos en las graficas están divididos en la población de células de canal de volteo-negativo/CD3⁻ positivo. Para evaluar la presencia de células B, se co-pigmentaron las muestras con anticuerpos para lograr CD14-APC y CD3-FITC (canales de volteo) y se hizo la evaluación para

detectar la presencia de células B en la fracción de canal de volteo-negativa mediante co-pigmentación con anticuerpos para formar CD20-PE y CD19-PE-Cy-7. En todos los casos, se establecieron cuadrantes de división negativa en controles sin tinción como se puede apreciar en las Figuras 4B y 4C. El inmunofenotipo de células T de CD4+ (Figura 4B) y CD8+ (Figura 4C). De los subconjuntos de células T pueden apreciarse. Las muestras de sangre periférica congelada tomadas de UPN 03 se obtuvieron mediante aféresis el día 56 y 169 post infusión de células T y se dejaron en reposo durante la noche en un medio de cultivo sin factores de adición, luego se lavaron y se sometieron a una inmunofenotipo multiparamétrico para lograr la expresión de los marcadores de memoria de célula T, activación y agotamiento. La estrategia de divisiones como se puede apreciar en la Figura 8, requirieron de una división inicial en el canal de volteo (CD14, CD16, Agua viva/muerta) – y células positivas CD3-, seguidas de divisiones positivas en las células CD4+ y CD8+. Se establecieron las divisiones y cuadrantes utilizando controles FMO (CAR, CD45RA, PD-1, CD25, CD127, CCR7) o bien haciendo divisiones en poblaciones de células positivas (CD3, CD4, CD8) y los sub-conjuntos fueron claramente delineados (CD27, CD28, CD57); posteriormente los datos fueron mostrados después de hacer una transformación bi-exponencial para lograr la visualización objetiva de los eventos. La Figura 4D muestra la competencia funcional de las células CAR persistentes. Las muestras de sangre periférica congelada tomadas de UPN 03 obtenidas por aféresis el día 56 y 169 post infusión de células T permanecieron durante la noche en un medio de cultivo sin factores adicionales, se lavaron y evaluaron directamente ex vivo

para establecer la capacidad de reconocer las células objetivo que expresa CD19- utilizando células de ensayos de desgranulación CD 107. Luego de una incubación por dos horas en presencia de anti-CD28, anti-CD49d, y CD107-FITC, se cultivaron las mezclas celulares, se lavaron y se sometieron a un análisis citométrico de flujo multi-paramétrico para evaluar la capacidad de las células CAR19 de hacer una des granulación como respuesta a los objetivos de expresión CD19. La estrategia de división involucro una compuerta inicial en los canales de volteo (CD14-PE-Cy7, CD16-PE-Cy7, Agua viva/muerta)- negativa y células positivas CD3-PE seguidas de divisiones en células positivas CD8-PE-Texas Red- presentándose datos para la población divisionada CD8+. En todos los casos, se establecieron los cuadrantes de división negativa en controles sin tinción.

La Figura 5 que comprende las Figuras 5A hasta 5C, es una serie de imágenes que muestran los resultados de experimentos que evalúan respuestas clínicas después de la infusión de células CART19. La Figura 5A muestra que UPN 02 se trato con dos ciclos de rituximab y bendamustine con respuesta mínima (R/B, flecha). Las células CART19 T fueron infundadas a partir de 4 días después de la administración de bendamustina solamente (flecha B). La leucemia resistente a rituximab y bendamustine se evacuó rápidamente de la sangre, como lo muestra el descenso en el conteo de linfocitos absolutos (ALC) desde 60,600/ μ l hasta 200/ μ l en un lapso de 18 días a partir de la infusión. El tratamiento con corticosteroides se inicio el día 18 post infusión debido a síndrome febril no infeccioso y malestares. La línea de referencia (punteada) indica el límite superior

de lo normal para ALC. La Figura 5B muestra los resultados de experimentos de ejemplo que tincionan la biopsia secuencial de medula ósea o muestras de coagulación tomadas del paciente UPN 01 y 03 para CD20. La infiltración pretratamiento con leucemia presente en ambos pacientes estuvo presente en muestras post tratamiento acompañadas por normalización de celularidad y hematopoyesis trilineaje. UPN 01 no ha presentado detección de células CLL como las evaluadas por medio de citometria de flujo, citogenética y fluorescencia de hibridización in situ ni se detectaron células normales B mediante citometria de flujo en medula ósea o sangre. El UPN 03 presentó 5% residual normal CD5- células B negativas confirmadas por citometria de flujo el día +23, lo cual también demostró que eran policlonales; sin que se detectaran células normales B en el día +176. La Figura 5C muestra los resultados de experimentos utilizando imágenes secuenciales CT para evaluar la rápida resolución de linfadenopatías generalizadas resistentes a la quimioterapia. Las masas axilares bilaterales se resolvieron al cabo de 83 (UPN 01) y 31 (UPN 03) días post infusión, como lo señalan las flechas y círculos.

La Figura 6, que comprende Figuras 6A hasta 6C, es una serie de imágenes que exhiben conteos absolutos de linfocitos y células totales CART19+ en circulación para UPN 01, 02, 03. El número total de linfocitos (total normal y células CLL) vs. Total CART19+ células en circulación se grafica para todos los tres sujetos que utilizan el conteo absoluto de linfocitos a partir de valores CBC, y asumiendo que existe un volumen de 5.0 L de sangre. El número total de células CART19 en

22

circulación se calculó empleando los valores tándem CBC con conteos absolutos de linfocitos y los valores de marcación Q-PCR como se señala en la Figura 2, convirtiendo las copias/ μ g ADN en promedio porcentual de marcación como se describió en otro apartado de este mismo documento. La marcación Q-PCR % demostró que se correlacionaba muy íntimamente (variación <2 veces) con la caracterización citométrica de flujo de los productos de infusión y con los datos tomados de las muestras en donde existió disponibilidad de datos de citometría de flujo concomitantes para enumerar directamente las células CART19 por tinción.

La Figura 7, que comprende Figuras 7A hasta Figura 7D es una serie de imágenes que muestran experimentos que tienen que ver con la detección directa ex vivo de células positivas CART19 en UPN-01 PBMC 71 días post- infusión de células T. UPN-01 PBMC recolectadas frescas post aféresis el día 71 post infusión, o congeladas en el momento de aféresis para manufactura del producto de célula T (línea basal) y descongelación viable con anterioridad a la tinción, se sometieron a análisis citométrico de flujo para detectar la presencia de células CART19 que expresan el medio CAR19 sobre la superficie. Para evaluar la expresión de CART19 en linfocitos, las muestras fueron tincionadas con CD3-PE y el anticuerpo idiотipo CAR19 se conjugó en Alexa-647, o se cotincionó con CD3-PE solamente (FMO para CAR19). La Figura 7A muestra que se estableció una división inicial de linfocitos de acuerdo con la dispersión hacia adelante y lateral (FSC vs SSC) seguida de la división en las células CD3+. La Figura 7B muestra la división de linfocitos CD3+; la Figura 7C muestra la tinción de idiotipos CAR; la Figura 7D

muestra FMO idiotipos CAR. La división positiva CAR19 se estableció en las muestras CAR19 FMO.

La Figura 8, que comprende Figuras 8A hasta Figura 8C es una serie de imágenes que muestran la estrategia de división para identificar la expresión CAR19 utilizando citometria de flujo policromático en muestras de sangre UPN 03. La estrategia de división para la Figura 8C se observa para la muestra UPN 03 día 56 y es una representación de la estrategia utilizada en la muestra UPN 03 día 169. La Figura 8A muestra división primaria: Volteo (CD14, CD16, Agua viva/muerta) negativa, CD3 positiva. La Figura 8B muestra divisiones secundarias: CD4-positiva, CD8 positiva. La Figura 8C muestra divisiones terciarias: CAR19 positiva y CAR19 negativa, establecidas en las muestras CAR FMO (paneles totalmente hacia la derecha).

La Figura 9 muestra la estrategia de división para identificar directamente la expresión CART19 y células B en muestras de sangre y medula. La estrategia de división para la Figura 4A, que muestra detección de CAR expresa CD3+ linfocitos y ausencia de células B en la periferia y medula: gráfico izquierdo: división celular; panel superior: división positiva para células CD3+, panel inferior: división negativa (negativa CD14, negativa CD3) para células B. NC365, células de control de sangre periférica provenientes de un donante saludable.

La Figura 10 es una imagen que resume la información demográfica del paciente y la respuesta de este último.

La Figura 11 muestra el proceso de manufactura de las células CART-19.

La Figura 12 comprende Figuras 12A hasta 12D, y es una serie de imágenes que exhiben la respuesta clínica en un paciente. La Figura 12A muestra el vector lentiviral utilizado para infectar células T provenientes del paciente. Se produjo un vector seudotipeado, lentiviral de grado clínico de proteína G del virus estomatitis vesicular (pELPs 19-BB-z) que dirige la expresión del anti CD19 scFv derivado del anticuerpo monoclonal murine FMC63, en el dominio humano CD8 α y transmembrana y dominios de señalización 4-1BB y CD3 ζ . Los detalles del transgen CAR19 en la base de la Figura 12A muestran los elementos funcionales principales. Esta Figura no está hecha a escala. 3' Prima LTR de nota 3' repetición larga terminal; 5'' LTR, 5' repetición larga terminal, Amp R, gen de resistencia a la ampicilina; Bovino GH Poly A, hormona del crecimiento bovino con poliadenilación; cPPT/ CTS, tracto de polipurina central con secuencia de terminación central; EF- α , factor de elongación 1-alfa; env, envoltura; gag, antígeno específico de grupo; Pol, HIV gen VIH que codifica polimerasa y transcriptasa reversa; R, repetición; RRE, elemento de respuesta rev; scFv, fragmento de variable de cadena sencilla; TM, transmembrana y WPRE, elemento regulatorio post-transcripcional del virus de hepatitis woodchuck. La Figura 12B muestra creatinina de suero, ácido úrico y niveles de hidrogenasa de lactato (LDH) desde el día 1 hasta el día 28 después de la primera infusión de células CART19. Los niveles pico coincidieron con hospitalización para el síndrome de lisis tumoral.

25

La Figura 12C muestra medula ósea – muestras de biopsia obtenidas 3 días después de la quimioterapia (día – 1, antes de la infusión celular CART19) y 23 días y 6 meses después de la infusión celular CART19 (hematoxilina y eosina). La muestra de línea basal indica medula ósea hipercelular (60%) con hematopoyesis trilineaje, infiltrada por agregados predominantemente intersticiales de linfocitos pequeños y maduros que son el responsable del 40% de la celularidad total. La muestra obtenida el día 23 indica agregados linfoides residuales (10%) que fueron negativos para leucemia linfocítica crónica (CLL), con una mezcla de células T y células B negativas CD5. El espécimen obtenido 6 meses después de la infusión indica hematopoyesis trilineaje, sin agregados linfoides y ausencia continuada de CLL. La Figura 12D muestra scan CT mejorados de contraste obtenidos antes de que el paciente se registrara en el estudio y 31 días y 104 días después de la primera infusión. El scan de preinfusión revela 1 a 3 cm de masas bilaterales. La regresión de la linfa de linfadenopatía axilar ocurrió dentro de 1 mes después de la infusión y se sostuvo. Las flechas resaltan los distintos nodos linfáticos aumentados antes de la terapia y las respuestas de nodo linfático en los scans CT comparables después de la terapia.

La Figura 13 que comprende Figuras 13 A hasta 13E, constituye una serie de imágenes que señalan citoquinas de medula ósea y suero antes y después de la infusión de células T del receptor antígeno quimérico. Las mediciones seriales del interferon- γ de citoquina (Figura 13A), el interferon gama de quemoquinas estimuladas C-X-C motif quemoquina 10 (CXCL 10) (Figura 13B) y C-X-C motif

ligando 9 (CXCL9) (Figura 13C), y interleuquina 6 (Figura 13D) se midieron en los puntos indicados para el tiempo. Los incrementos de estas citoquinas inflamatorias y quemoquinas coincidieron con la aparición del síndrome de lisis tumoral. Los bajos niveles de interleuquina 6 fueron detectados en la línea basal, en tanto que el interferon- γ , CXCL9, y CXCL10 estuvieron por debajo de los límites de detección en la línea basal. Los rangos de curva estándar para los analitos y valore de línea basal en el paciente, que aparecen entre paréntesis, fueron como sigue: interferon- γ , 11.2 hasta 23,972 pg. por mililitro (1.4 pg por mililitro); CXCL10, 2.1 hasta 53 19 pg. por mililitro (274 pg. por mililitro); CXCL9, 48.2 HASTA 3700 pg. por mililitro (177 pg. por mililitro); interleukin-6, 2.7 hasta 4572 pg. por mililitro (8.3 pg. por mililitro); factor α de necrosis tumoral (TNF- α), 1.9 hasta 4005 por mililitro (sin detectar); y receptor interleuquina 2 soluble, 13.4 hasta 34.210 pg. por mililitro (644 pg. por mililitro). La Figura 13E muéstrala inducción de la respuesta inmune en medula ósea. Las citoquinas TNF- α , interleuquina-6, interferon- γ , quimoquina CXCL9, y receptor interleuquina 2 soluble fueron medidas en fluidos supernatantes obtenidos a partir de aspirados de medula ósea en los días señalados antes y después de la infusión celular CART19. Los incrementos en niveles de interleuquin-6, interferon- γ , CXCL9 e interleuquina 2 soluble del receptor coincidieron con el síndrome de lisis tumoral, infiltración de células T de receptor de antígeno quimérico pico, y erradicación de infiltrado leucémico.

La Figura 14 que comprende Figuras 14A hasta 14C es una serie de imágenes que muestra expansión y persistencia de células T del receptor antígeno quimérico in vivo. El ADN Genómico (gADN) se aisló de las muestras de sangre entera del paciente (Figura 14A) y los aspirados de medula ósea (Figura 14B) se recolectaron en puntos seriales del tiempo antes y después de la infusión de células T de recepción de antígeno quimérico y se utilizaron para análisis de reacción de cadena de polimerasa en tiempo real cuantitativa (PCR). De acuerdo con las evaluaciones con base en ADN transgénico y valor porcentual de los linfocitos que expresan el CAR19, se expandieron las células T del receptor antígeno quimérico hasta niveles que fueron superiores a mil veces tan elevados como los niveles iniciales de injertos en sangre periférica y medula ósea. Los niveles pico de células T de receptor de antígeno quimérico se correlacionaron temporalmente con el síndrome de lisis tumoral. Una muestra de sangre obtenida en el día 0 y una muestra de medula ósea obtenida el día 1 no presentaron señales PCR en línea basal. El análisis citométrico de flujo de aspirados de medula ósea en línea basal (Figura 14C) muestra un infiltrado predominante con células CD19+CD5+ que fueron clonales, de acuerdo con la evaluación que se hizo utilizando inmuno-globulina kappa tinción luz-cadena, con una paucidad de células T. El día 31 después de la infusión, las células CD5+ T que estuvieron presentes, y no se detectaron células normales o malignas B. Los números indican la frecuencia relativa de las células en cada cuadrante. Tanto el eje X como el eje Y muestran una escala log 10. La estrategia de división por compuertas implicó una división inicial en las células CD19+ y CD5+ en las

casillas ubicadas a la izquierda, con la identificación posterior de expresiones kappa y lambda de inmunoglobulina en el sub-conjunto CD19+ CD5+ (casillas al lado derecho).

DESCRIPCION DETALLADA

El invento se relaciona con posiciones y métodos para tratamiento de cáncer, que incluyen pero no se limitan a malignancias hematológicas y tumores sólidos. El presente invento se relaciona con una estrategia de transferencia de células adoptivas de células T transducidas para expresar un receptor antígeno quimérico (CAR). Los CARs son moléculas que combinan especificidad basada en anticuerpos para un antígeno deseado (por ejemplo un antígeno tumoral) con un dominio intracelular que activa el receptor de célula T para generar una proteína quimérica que exhiba una actividad inmune celular específica antitumoral.

El presente invento se relaciona en términos generales con el uso de células T genéticamente modificadas para expresar en forma estable un CAR deseado. Las células T que expresan un CAR se conocen en este documento como células CAR T o como células modificadas CAR T. Preferiblemente, la célula puede modificarse genéticamente para expresar en forma estable un dominio de unión de anticuerpos sobre su superficie, confiriendo especificidad novedosa de antígeno que es independiente MHC. En algunos casos, la celular T es modificada genéticamente con el fin de expresar de manera estable un CAR que combine un

dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico con un dominio intracelular de la cadena zeta CD3 o proteína FcγRI dentro de una sola proteína quimérica.

En una presentación, el CAR del invento comprende un dominio extracelular que tiene un dominio de reconocimiento de antígeno, un dominio de transmembrana y un dominio citoplasmico. En una presentación, el dominio de transmembrana que se asocia en forma natural con uno de los dominios en el CAR es el utilizado en este caso. En otra presentación, se puede seleccionar el dominio de transmembrana o bien modificarse mediante una sustitución aminoácida con el objeto de evitar la unión de dichos dominios con los dominios de transmembrana de las mismas o distintas proteínas de membrana de superficie con el objeto de minimizar las interacciones con los demás miembros del complejo receptor. Preferiblemente, el dominio de transmembrana es el dominio de vinculo CD8α.

Con respecto del dominio citoplasmico, el CAR del invento puede diseñarse para que comprenda el dominio de señalización CD28 y/o 4-1BB por sí mismo o bien combinarse con cualquier otro dominio o dominios citoplasmicos deseados útiles dentro del contexto del CAR del invento. De acuerdo con una presentación, el dominio citoplasmico del CAR puede diseñarse para que comprenda además el dominio de señalización de CD3 zeta. Por ejemplo, el dominio citoplasmico del CAR puede incluir pero sin limitarse a los módulos de señalización CD3 zeta, 4-

1BB y CD28 y sus combinaciones. En este orden de ideas, el invento proporciona células CAR T y métodos para su uso dentro de la terapia adoptiva.

Según una presentación, las células CAR T del invento se pueden generar mediante la introducción de un vector lentiviral que comprende un CAR deseado, por ejemplo un CAR que comprenda unión anti-CD19, CD8 α y dominio de transmembrana, además de dominios de señalización humana 4-1BB y CD3 zeta dentro de las células. Las células CAR T del invento pueden replicarse in vivo produciendo persistencia a largo plazo que puede conducir al control tumoral sostenido.

Según una presentación el invento se relaciona con la administración de una célula genéticamente modificada T que expresa un CAR para el tratamiento de un paciente que tenga cáncer o se encuentre en riesgo de tenerlo utilizando infusión linfocita. Preferiblemente, la infusión de linfocito autologo se utiliza en el tratamiento. Los PBMCs autologos se recolectan a partir de un paciente que necesite de tratamiento y las células T se activan y expanden aplicando los métodos descritos en este documento y conocidos en la técnica y luego haciendo la infusión nuevamente al paciente. En otra presentación más, el invento se relaciona en términos generales con el tratamiento de un paciente en condiciones de riesgo de desarrollarle CLL. El invento también incluye el tratamiento de malignancia o de enfermedad autoinmune en la cual la quimioterapia y/o

inmunoterapia en un paciente produce inmunosupresión significativa en el mismo, aumentando de esta manera el riesgo de que el paciente desarrolle CLL.

El invento incluye el uso de células T que expresan un anti-CD19 CAR que incluye dominio costimulatorio CD3 zeta y el 4-1 BB (que se conoce también como células CART19 T). Las células CART19 T del invento pueden someterse a una expansión celular robusta in vivo T y además pueden establecer células de memoria específica CD19 que persisten a altos niveles durante un periodo prolongado de tiempo en la sangre y medula ósea. En algunos casos, las células CART19 T del invento infundidas al paciente pueden eliminar células de leucemia in vivo en pacientes con CLL avanzado resistente a la quimioterapia. Sin embargo, el invento no se limita a las células CART19. Mas bien, el invento incluye un medio de unión de antígeno fusionado con uno o más dominios intracelulares seleccionados a partir del grupo del dominio de señalización CD137 (4-1BB), un dominio de señalización CD28, un dominio de señal CD3 zeta y cualquiera de sus combinaciones.

Definiciones

A menos que se defina de otra manera, los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen los mismos significados que se entienden en forma común por parte de una persona con conocimientos corrientes en la técnica a la cual pertenece el invento. Aun cuando algunos métodos y materiales

similares o equivalentes a los descritos en este documento puedan utilizarse en la práctica para la prueba del presente invento, los materiales y métodos preferidos son los que aquí se describen. Al describir y reivindicar el presente invento, se utilizará la siguiente terminología.

Debe igualmente entenderse que la terminología aquí utilizada es con el fin de describir presentaciones en particular solamente y su objeto no es limitante.

Los artículos indefinidos para masculino y femenino se utilizan en este documento para hacer referencia a uno o más de uno (por lo menos uno) de los objetos gramaticales de ese artículo. A manera de ejemplo "un elemento" se refiere a un elemento o más de uno.

El término "aproximadamente" como se utiliza en este documento al referirse a un valor medible como cantidad, duración temporal y similares tiene por objeto abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$ y mas preferiblemente $\pm 5\%$ incluso se prefiere mas $\pm 1\%$ e incluso se prefiere mas $\pm 0.1\%$ con respecto del valor específico, en la medida en que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos revelados.

"Activación", según se utiliza en este documento, se refiere al estado de una célula T que se estimuló suficientemente para inducir proliferación celular detectable. La activación también se puede asociar con la producción inducida de citoquina y

funciones detectables del efector. El término "células T activadas" se refiere entre otros aspectos a las células T que se están sometiendo a una división celular.

El término "anticuerpo", según se utiliza en este documento se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas que se derivan de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y pueden ser porciones inmunoreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos son típicamente tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos del presente invento pueden existir en una variedad de formas que incluyen por ejemplo anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, Fv, Fab y F (ab)₂ al igual que anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos humanizados (Haarlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242: 423-426).

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y además hace referencia a las regiones variables determinadas por el antígeno de un anticuerpo intacto.

Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos están, pero no se limitan a Fab, Fab', F (ab')₂ y fragmentos Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos scFv y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

El término "cadena pesada de anticuerpo", como se utiliza en este documento se refiere a la mayor de los dos tipos de cadenas de polipéptidos presentes en todas las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones de ocurrencia natural.

Una "cadena ligera de anticuerpo" según se utiliza en este documento se refiere a la más pequeña de las cadenas de dos tipos de polipeptidos presentes en todas las moléculas de anticuerpos en sus conformaciones de ocurrencia natural. Las cadenas ligeras kappa y lambda se refiere a los dos principales isotopos de cadena ligera de anticuerpos.

El término "anticuerpo sintético" como se utiliza en este documento, se refiere a un anticuerpo que se genera utilizando tecnología ADN recombinante, por ejemplo el anticuerpo expresado por un bacteriófago según se describe en este documento. El termino debe ser también interpretado como el anticuerpo que ha sido generado por la síntesis de una molécula ADN que codifica el anticuerpo y donde la molécula ADN expresa una proteína de anticuerpo, o bien una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, donde el ADN o la secuencia de aminoácido se obtuvo utilizando ADN sintético o tecnología de secuencia de

aminoácidos que se encuentra disponible y se conoce perfectamente dentro de la técnica.

El término "antígeno" o "Ag" como se utiliza en este documento se define como una molécula que provoca una respuesta inmune. Esta respuesta inmune puede implicar producción de anticuerpos, o la activación de células específicas competentes desde el punto de vista inmunológico, o ambos casos. El experto en el tema comprenderá que cualquier macromolécula, incluyendo prácticamente todas las proteínas o péptidos pueden actuar como antígeno. Por otra parte, los antígenos se pueden derivar a partir de ADN recombinantes o genómicos. El experto en el tema comprenderá que cualquier ADN, que comprenda una secuencia nucleotida o una secuencia nucleotida parcial que codifique una proteína mostrara una respuesta inmune y por lo tanto codifica un "antígeno" tal y como se utiliza este término en la presente documentación. Por otro lado, la persona experta en la materia comprenderá que un antígeno no necesita codificarse única y exclusivamente mediante el uso de una secuencia nucleotida de longitud completa de un gen. Resulta obvio que el presente invento incluye pero sin limitarse al uso de secuencias nucleotidas parciales de más de un gen y que estas secuencias nucleotidas se disponen en diversas combinaciones con el fin de mostrar la respuesta inmune deseada. Además de lo anterior, el experto entenderá que un antígeno no necesariamente es codificado por un "gen". Resulta notorio que un antígeno se puede generar sintetizado o puede derivarse a

partir de una muestra biológica. Esta muestra biológica podrá incluir pero sin limitarse a una muestra de tejido, muestra tumoral, célula o tejido biológico.

El término "efecto anti-tumoral" como se utiliza en este documento se refiere a un efecto biológico que puede ser manifestado por un descenso en el volumen tumoral, un descenso en el número de células tumorales, disminución en el número de metástasis, aumento en la esperanza de vida o reducción de diversos síntomas fisiológicos asociados con la condición cancerosa. El "efecto antitumoral" puede también manifestarse mediante la capacidad que tengan los péptidos, poli-nucleótidos, células y anticuerpos del invento para prevenir la ocurrencia de tumor en primer lugar.

El término "auto-antígeno" se refiere de acuerdo con el presente invento a cualquier auto-antígeno que se reconozca erróneamente por parte del sistema inmune como extraño. El auto-antígeno comprende pero no se limita a proteínas celulares, fosfoproteínas, proteínas de la superficie celular, lípidos celulares, ácidos nucleicos, glicoproteínas, incluyendo receptores de superficie celular.

El término "enfermedad autoinmune" como se utiliza en este documento se define como un trastorno que resulta a partir de una respuesta autoinmune. La enfermedad autoinmune es el resultado de una respuesta inapropiada y excesiva a un auto-antígeno. Entre los ejemplos de enfermedades autoinmunes están pero sin limitarse a la enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis

anquilosante, hepatitis autoinmune, parotitis autoinmune, enfermedad de Crohn, diabetes (Tipo I), epidermólisis bullosa distrofica, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pemfigus vulgaris, soriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, escleroderma, síndrome de Sjögren, espondiloartropatías, tiroiditis, vasculitis, vitíligo, mixedema, anemia perniciosa, colitis ulcerativa, entre otras.

De acuerdo con este documento el término "autólogo" se refiere a cualquier material derivado del mismo individuo al cual deberá reintroducirse posteriormente.

El término "Alogénico" se refiere a un injerto derivado de un animal distinto que sea de la misma especie.

El término "Xerogénico" se refiere a un injerto derivado de un animal de distinta especie.

El término "Cáncer" como se utiliza en este documento se define como la enfermedad caracterizada por el crecimiento rápido y descontrolado de células aberrantes. Las células del cáncer se pueden diseminar localmente o a través del flujo sanguíneo y del sistema linfático a otras partes del organismo. Entre los ejemplos de los distintos cánceres están pero sin limitarse al cáncer de seno, de

próstata, de ovario, cervical, piel, pancreático, colorectal, renal, hígado, cerebro, linfoma, leucemia, pulmonar y similares.

El término "ligando Co-estimulador" tal y como se utiliza en este documento incluye una molécula sobre un antígeno que presenta una célula (por ejemplo una aAPC, célula dendrígena, célula B y similares) que se une específicamente a una molécula co-estimuladora conocida en una célula T, suministrando de esta manera una señal que en forma adicional a la señal primaria suministrada, por ejemplo se une a un complejo TCR/CD3 con una molécula MHC cargada con péptido, que media una respuesta de célula T, incluyendo pero sin limitarse a la proliferación, activación, diferenciación y procesos similares. Un ligando co-estimulador puede incluir pero sin limitarse a CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando co-estimulador inducible (ICOS-L), molécula de adición intercelular (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, beta receptor de limfotoxina, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, un agonista o anticuerpo que una el receptor ligando Toll como un ligando que una específicamente con B7-H3. Un ligando co-estimulador comprende entre otros aspectos un anticuerpo que se una específicamente con una molécula co-estimuladora presente en una célula T, que puede ser pero sin limitarse a, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno-1 asociado con la función linfocítico (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y un ligando que se une específicamente con CD83.

Una "molécula co-estimuladora" se refiere a la compañera conocida de unión en una célula T que se vincula específicamente con un ligando co-estimulador, mediando de esta manera una respuesta co-estimuladora por parte de la célula T, incluyendo pero sin limitarse a la proliferación. Las moléculas co-estimuladoras incluyen pero no se limitan a las moléculas MHC clase I, BTLA y receptor ligando Toll.

Una "señal co-estimuladora" como se utiliza en este documento se refiere a una señal que en combinación con otra señal primaria, que puede ser el ligando TCR/CD3, conduce a una proliferación de célula T y/o sobre regulación o sub-regulación de moléculas claves.

Una "enfermedad" es un estado de salud de un animal en el cual este no puede mantener homeostasis, y si la enfermedad no se mejora la salud del animal continua deteriorándose. Por el contrario, el "desorden" en un animal es un estado de salud en el cual este último está en condiciones de mantener la homeostasis, pero el estado de salud del animal es menos favorable que lo que podría ser en ausencia del desorden o trastorno. Si el trastorno se deja sin tratar, este no necesariamente causa una disminución posterior en el estado de salud del animal.

Una "cantidad eficaz" como se utiliza en este documento, se refiere a una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico o profiláctico.

"Codificación" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, que puede ser un gen, un cADN, o un mRNA, que sirvan como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas dentro de procesos biológicos que tengan una secuencia definida de nucleótidos (por ejemplo, rARN, tARN y mRNA) o bien una secuencia definida de aminoácidos y propiedades biológicas que resulten de dichas condiciones. En este orden de ideas, un gen codifica una proteína si la transcripción y traslado del mRNA correspondiente a dicho gen produce la proteína dentro de una célula otro sistema biológico. Tanto la cadena de codificación, la secuencia de nucleótidos de la que es idéntica a la secuencia mRNA por lo general se suministra en listados de secuencias y la cadena no-codificante utilizada como plantilla para transcripción de un gen o cADN se puede conocer como codificación de la proteína u otro producto de dicho gen o cADN.

Como se utiliza en este documento el término "endógeno" se refiere a cualquier material proveniente de o producido dentro de un organismo, célula, tejido o sistema.

De acuerdo con el uso en este documento el término "exógeno" se refiere a cualquier material introducido a partir de o producido por fuera de un organismo, célula, tejido o sistema.

41

El término "expresión" como se utiliza en este documento se define como la transcripción y/o traslado de una secuencia nucleótida en particular accionada por su promotor.

"Vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante conformado por secuencias de control de expresión vinculadas operativamente a una secuencia de nucleótidos que debe expresarse. Un vector de expresión comprende elementos suficientes cis-actantes para la expresión; otros elementos para expresión se pueden suministrar por medio de las células huéspedes o en un sistema de expresión in vitro. Los vectores de expresión incluyen todos aquellos conocidos en la técnica, como cosmidos, plasmidos (por ejemplo, descubiertos o contenidos en liposomas) y virus (por ejemplo, lentivirus, retrovirus, adenovirus y adeno-asociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.

El término "homologo" se refiere a la similaridad de secuencia o identidad de secuencia entre dos polipeptidos o entre dos moléculas del ácido nucléico. Cuando una posición en las dos secuencias comparadas se ocupa por la misma base o sub-unidad de monómero aminoácido, por ejemplo si una posición en cada una de las dos moléculas ADN se ocupa por adenina, entonces las moléculas son homólogas en dicha posición. El porcentaje de homología entre dos secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homologas compartidas por las dos secuencias divididas por el número de posiciones comparadas X100.

42

Por ejemplo si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias son coincidentes u homologas entonces las dos secuencias son homologas al 60%. Por vía de ejemplo, las secuencias ADN, ATTGCC y TATGGC comparten una homología al 50%. En términos generales, se hace una comparación cuando dos secuencias quedan alineadas para proporcionar una homología máxima.

El término "inmunoglobulina" o "Ig", como se utiliza en este documento se define como una clase de proteínas, que funcionan a manera de anticuerpos. Los anticuerpos expresados por células B se conocen algunas veces como BCR (receptor de célula B) o receptor de antígeno. Los cinco miembros incluidos en esta clase de proteínas son IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. IgA es el anticuerpo primario que se encuentra presente en las secreciones corporales, tales como saliva, lágrimas, leche materna, secreciones gastrointestinales y secreciones de la mucosa de los tractos respiratorio y genitourinario. IgG es el anticuerpo circulante más común. IgM es la inmunoglobulina principal producida en la respuesta inmune primaria de la mayoría de sujetos. Se trata de la inmunoglobulina más eficiente en aglutinación, fijación de complemento y otras respuestas de anticuerpos y es importante en la defensa contra las bacterias y virus. IgD es la inmunoglobulina que no tiene función de anticuerpos conocida, pero que puede servir como receptor de antígeno. IgE es la inmunoglobulina que media una hipersensibilidad inmediata causando liberación de mediadores a partir de células madres y basofilos en el momento de exposición a un alérgeno.

De acuerdo con el presente documento, el "material instructivo" incluye una publicación, registro, diagrama o cualquier otro medio de expresión que se pueda utilizar para comunicar la utilidad de las composiciones y métodos del invento. El material instructivo del kit del invento puede por ejemplo colocarse en un recipiente que contenga el ácido nucleico, péptidos y/o composición del invento o bien enviarse junto con un recipiente que contenga el ácido nucleico, péptido y/o composición. De manera alterna, el material instructivo puede ser enviado por separado del contenedor con el propósito que dicho material y el compuesto puedan ser utilizados conjuntamente por parte del receptor de dicha información.

"Aislado" se refiere a lo alterado o retirado de su estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o péptido presentes en forma natural en un animal vivo no se encontrarán "aislados" sin embargo el mismo ácido nucleico o péptido separados total o parcialmente de los materiales coexistentes de su estado natural quedaran "aislados". Un ácido nucleico o proteína aislada pueden existir en forma sustancialmente pura, o incluso pueden existir en un ambiente no nativo por ejemplo en una célula huésped.

En el contexto del presente invento, las siguientes abreviaturas se utilizan para las bases del ácido nucleico que ocurren comúnmente. "A" se refiere a la adenosina, "C" se refiere a la citocina, "G" se refiere a la guanocina, "T" se refiere a la timidina, y "U" se refiere a la uridina.

A menos que se especifique un procedimiento distinto, una "secuencia nucleótida que codifique una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias nucleótidas que son versiones degeneradas de cada una y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La frase secuencia nucleótida que codifica una proteína o un ARN pueden también incluir intrones en la medida en que la secuencia nucleótida que codifique la proteína pueda en cierta versión contener uno o mas intrones.

Un "lentivirus" como se utiliza en este documento se refiere a un genero de la familia Retroviridae. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus en el sentido que son capaces de infectar células que no se dividen y pueden proporcionar una cantidad significativa de información genética dentro del ADN de la célula huésped, de tal manera que constituyen uno de los más eficientes métodos de vectores de entrega de genes. El VIH, SIV y el FIV son todos ejemplos de lentivirus. Los vectores derivados de los lentivirus ofrecen los medios necesarios para alcanzar niveles significativos de transferencia de genes in vivo.

El término "modulador" como se utiliza en este documento, significa la mediación de un incremento o decremento detectables en el nivel de una respuesta en un sujeto en comparación con el nivel de una respuesta en el sujeto en ausencia de un tratamiento o compuesto y/o en comparación con el nivel de una respuesta en un sujeto idéntico pero sin tratar. El término comprende perturbación y/o afectación de una señal o respuesta nativa mediando de esta manera una

respuesta terapéutica beneficiosa en un sujeto, preferiblemente un humano. A menos que se especifique un procedimiento distinto, la "secuencia nucleotida que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias nucleotidas que son versiones degeneradas de cada una de ellas y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias nucleotidas que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

El término "operativamente vinculadas" se refiere a una unión funcional entre una secuencia regulatoria y una secuencia del ácido nucleico heterologo resultante en la expresión de este ultimo. Por ejemplo, una primera secuencia del ácido nucleico se vincula de una manera operacional con una segunda secuencia del ácido nucleico cuando la primera secuencia del ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia del ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor se une operacionalmente a una secuencia de codificación si el promotor afecta la transcripción o expresión de la secuencia de codificación. En términos generales, las secuencias ADN vinculadas operacionalmente son contiguas y en la medida de lo necesario unen dos regiones de codificación de proteínas, dentro del mismo marco de lectura.

El término "sobre expresado" para antígeno tumoral o "sobre expresión" del antígeno tumoral indicara un nivel anormal de expresión del antígeno tumoral en una célula a partir de un área de enfermedad como tumor solido dentro de un tejido u órgano específicos del paciente en relación con el nivel de expresión

dentro de una célula normal a partir de dicho tejido del órgano. Los pacientes que tienen tumores sólidos o malignancia hematológica caracterizada por sobre expresión del antígeno tumoral se pueden determinar mediante ensayos estándar conocidos en la técnica.

La administración "parenteral" de una composición inmunogenica incluye, por ejemplo, técnicas subcutáneas (s.c.), intravenosas (i.v.), intramusculares (i.m.) o inyección intrasternal o infusión.

Los términos "paciente", "sujeto", "individuo" y similares se utilizan de manera indistinta en este documento y hacen referencia a un animal o células del mismo, ya sea in vitro o in situ, referentes a los métodos descritos en este trabajo. En algunas presentaciones no limitantes, el paciente, el sujeto o el individuo es un humano.

El término "polinucleotido" como se utiliza en este trabajo se define como una cadena de nucleótidos. Además de lo anterior, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. De esta manera, los ácidos nucleicos y polinucleotidos como se utilizan en este trabajo son intercambiables. Una persona conocedora de esta técnica tiene la información general en el sentido que los ácidos nucleicos son polinucleotidos, que pueden hidrolizarse para formar "nucleótidos" monoméricos. Los nucleótidos monoméricos pueden hidrolizarse para formar nucleosidos. De acuerdo con la terminología de este documento los polinucleotidos incluyen pero

no se limitan a la totalidad de secuencias del ácido nucleico que se obtienen aplicando cualquier medio disponible en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a los medios recombinantes, como son el clonado de secuencia del ácido nucleico a partir de una librería recombinante o un genoma celular, utilizando la tecnología corriente del clonado y el PCR™ y similares, como también por medios sintéticos.

De acuerdo con la terminología utilizada en este trabajo, los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente y se refieren a un compuesto conformado por residuos de aminoácidos vinculados en forma covalente por lapsos péptidos. Una proteína o péptido deberá contener como mínimo dos aminoácidos y no se impone ninguna limitación sobre el número máximo de aminoácidos que puedan comprender una secuencia de proteínas o péptidos. Los polipeptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprenda dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces de péptidos. De acuerdo con esta terminología, el concepto se refiere a cadenas cortas, que también se conocen comúnmente en la técnica como péptidos, oligopeptidos y oligomeros, por ejemplo y como cadenas más largas que se conocen en términos generales en la técnica como proteínas, de las cuales existen muchos tipos. El término "polipeptidos" incluye por ejemplo fragmentos biológicamente activos, polipeptidos sustancialmente homólogos, oligopeptidos, homodimeros, heterodimeros, variantes de polipeptidos, polipeptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Los polipeptidos incluyen péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos o una combinación de los mismos.

El término "promotor" como se utiliza en este documento se define como una secuencia ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o la maquinaria sintética introducida, que se requiere para iniciar la transcripción específica de una secuencia de polinucleótidos.

De acuerdo con esta terminología, el término "secuencia promotora/regulatoria" se refiere a una secuencia del ácido nucleico que se requiere para expresión de un producto de gen vinculado operacionalmente a la secuencia promotora/regulatoria. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora nucleó y en otros casos, esta secuencia puede también incluir una secuencia de aumento y otros elementos regulatorios que se requieren para la expresión del producto genético. La secuencia promotora/regulatoria puede por ejemplo ser aquella que exprese el producto genético en una forma específica para el tejido.

Un promotor "constitutivo" es una secuencia nucleótida que, cuando se vincula en forma operacional con un polinucleótido que codifique o especifique un producto genético, hace que este producto se genere en una célula bajo la mayoría o la totalidad de condiciones fisiológicas de dicha célula.

El promotor "inducible" es una secuencia de nucleótidos que cuando se vincula en forma operacional con un polinucleótido que codifique o especifique un producto

de gen, hace que este producto se elabore en una célula sustancialmente cuando esté presente un inductor que corresponda al promotor dentro de la célula.

Un promotor "específico para el tejido" es una secuencia nucleótida que cuando se vincula en forma operacional con un polinucleótido codifica o se especifica por un gen, haciendo que el producto genético se elabore dentro de una célula sustancialmente tan solo si la célula corresponde al tipo celular del promotor.

El término "específicamente une" tal y como se utiliza en este trabajo con respecto de un anticuerpo, se refiere al anticuerpo que reconozca un antígeno específico, pero que no reconozca sustancialmente ninguna otra molécula dentro de una muestra. Por ejemplo, un anticuerpo que una específicamente a un antígeno proveniente de una especie puede también unirse a dicho antígeno a partir de una o más especies. Sin embargo esta reactividad a través de especies no modifica por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En otro ejemplo, un anticuerpo que específicamente se una a un antígeno puede también unirse a distintas formas alelicas del antígeno. Sin embargo, esta reactividad transversal no modifica por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En algunos casos, los términos "uniones específicas" o "específicamente unidas" se pueden utilizar con referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, para significar que la interacción depende de la presencia de una estructura en particular (por ejemplo, un determinante antigénico o epitope) en las especies

50

químicas; por ejemplo un anticuerpo reconoce y se une a una estructura específica de proteína en lugar de hacerlo a las proteínas en términos generales. Si un anticuerpo es específico para el epítopo "A", la presencia de una molécula que contenga epítopo A (o A libre sin etiquetar), dentro de una reacción que contenga "A" etiquetada y el anticuerpo, reducirán la cantidad de A etiquetada que se une al anticuerpo.

El término "estimulación" se refiere a una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimuladora (por ejemplo el complejo TCR/CD3) con su ligando conocido mediando por lo tanto un evento de transducción de señal, que puede ser entre otros la transducción de señal vía complejo TCR/CD3. La estimulación puede mediar la expresión alterada de ciertas moléculas, como la subregulación de TGF- β y/o reorganización de estructuras cito esqueléticas y similares.

Una "molécula estimuladora" tal y como se utiliza este término en el presente documento, se refiere a una molécula en una célula T que se une específicamente con un ligando conocido estimulador presente en una célula que presente el antígeno.

El "ligando estimulador" como se utiliza en este trabajo se refiere a un ligando que cuando está presente en una célula que presente el antígeno (por ejemplo aAPC, célula dendrítica, célula B y similares) puede unirse específicamente con un asociado conocido de vinculación (que se conoce aquí como "molécula

estimuladora”) en una célula T, mediando de esta manera una respuesta primaria por medio de la célula T, incluyendo pero sin limitarse a la activación, iniciación de respuesta inmune, proliferación y similares. Los ligandos estimulatorios son bien conocidos en la técnica y comprenden entre otros aspectos las moléculas Clase I MHC cargadas con un péptido y el anticuerpo anti-CD3, el anticuerpo anti-CD28 superagonista y un anticuerpo anti-CD2 superagonista.

El término “sujeto” incluye organismos vivientes en los cuales se puede observar la respuesta inmune (por ejemplo en los mamíferos). Entre los ejemplos de sujetos están los humanos, perros, gatos, ratas machos, ratas y sus especies transgénicas.

De acuerdo con esta terminología una “célula sustancialmente purificada” es aquella que se encuentra esencialmente libre de otros tipos de células. Una celular sustancialmente purificada se refiere también a una célula que ha sido separada de los demás tipos celulares con los cuales se asocia normalmente en su estado de ocurrencia natural. En algunos casos, una población de células sustancialmente purificadas se refiere a una población homogénea de células. En otros casos, este término se refiere simplemente a la célula que ha sido separada de aquellas células con las cuales se asocia en forma natural en su estado natural. En algunas presentaciones, las células se cultivan in vitro y en otras presentaciones estas no se cultivan in vitro.

52

El término "terapéutico" como se utiliza en este documento se refiere a un tratamiento y/o profilaxis. Se obtiene el objeto terapéutico mediante supresión, remisión o erradicación de un estado patológico.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del compuesto sujeto que mostrara la respuesta biológica o medica de un tejido, sistema o sujeto que se está tratando de buscar por parte del investigador, veterinario, medico humano u otro clínico. El término "cantidad terapéuticamente eficaz" incluye la cantidad de un compuesto que cuando se administre es suficiente para prevenir el desarrollo de signos o síntomas del trastorno o enfermedad que se trate o bien lo alivia hasta cierto punto. La cantidad terapéuticamente eficaz variara de acuerdo con el compuesto, la patología y su severidad y edad, peso, etc., del sujeto que se somete a tratamiento.

"Tratar" una enfermedad según implica este término, se refiere a reducir la frecuencia o severidad de por lo menos un signo o síntoma de una enfermedad o trastorno experimentado por un sujeto.

El término "transfectado" o "transformado" o "transducido" como se utiliza en este documento se refiere a un proceso mediante el cual el ácido nucléico exógeno es transferido o introducido dentro de la célula huésped. Una célula "transfectada" o "transformada" o "transducida" es aquella que ha sido transfectada, transformada

57

o transducida con ácido nucléico exógeno. La celular incluye la célula del sujeto primario y su progenie.

La frase "bajo control transcripcional" o "unida operacionalmente" como se utiliza en este documento se refiere a que el promotor esta en el sitio y orientación correctos en relación con un polinucleotido para controlar la iniciación de transcripción por medio de la polimerasa ARN y la expresión del polinucleotido.

Un "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucléico aislado y que puede utilizarse para administrar el ácido nucléico aislado al interior de una célula. Se conocen numerosos vectores en la técnica incluyendo pero sin limitarse a los polinucleotidos lineales, polinucleotidos asociados con compuestos iónicos o amfifílicos, plásmidos y virus. Así las cosas, el término "vector" incluye un plásmido o virus de replicación autónoma. El termino también deberá interpretarse de manera que incluya compuestos no plásmidos y no virales que faciliten la transferencia del ácido nucléico al interior de las células, como es el caso de compuestos polilicina, liposomas y similares. Entre los ejemplos de vectores virales están entre otros los vectores adenovirales, vectores de virus adenoasociados, vectores retrovirales y similares.

Rangos: a través de toda esta revelación, existen varios aspectos del invento que se pueden presentar en un formato de rango. Deberá entenderse que la descripción en el formato de rango es simplemente por conveniencia y brevedad y

25

no deberá interpretarse como una limitación inflexible con respecto del alcance del invento. En este orden de ideas, la descripción de un rango deberá considerarse como una presentación específica de todos los sub-rangos posibles al igual que de los valores numéricos individuales al interior de dicho rango. Por ejemplo, la descripción de un rango de 1 a 6 deberá considerarse como revelado específicamente en sub-rangos como aquel de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., al igual que los números individuales al interior de dicho rango, por ejemplo, 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3 y 6. Lo anterior se aplica independientemente de la profundidad de dicho rango.

Descripción

El presente invento proporciona composiciones y métodos para el tratamiento del cáncer entre otras enfermedades. El cáncer puede ser una malignancia hematológica, tumor sólido, tumor primario o metástasis tumoral. Preferiblemente, el cáncer es una malignancia hematológica y más preferiblemente el cáncer es una Leucemia Linfocítica Crónica (CLL). Otras enfermedades tratables que utilizan las composiciones y métodos del invento incluyen infecciones virales bacteriales y parasíticas al igual que enfermedades autoinmunes.

En una presentación, el invento proporciona una célula (por ejemplo, celular T) modificada para que exprese un CAR en donde la célula CAR T exhibe una propiedad anti-tumoral. El CAR del invento puede modificarse de manera que

55

comprenda un dominio extracelular que tenga un dominio de unión de antígeno fusionado con un dominio de señalización intracelular de la cadena zeta del complejo receptor antígeno celular T (por ejemplo CD3 zeta). El CAR del invento cuando se expresa en una célula T estará en condiciones de redirigir el reconocimiento de antígenos de acuerdo con la especificidad de uniones del antígeno. Un antígeno ejemplar es el CD19 por cuanto este antígeno se expresa en las células malignas B. Sin embargo, el invento no está limitado a enfocarse al CD19. Mas bien, el invento incluye cualquier medio de unión del antígeno que cuando se une a su antígeno conocido, afecta una célula tumoral de tal manera que la célula tumoral no puede crecer, esta llevada a morir o se afecta de alguna manera de tal forma que la carga tumoral en un paciente disminuye o bien se elimina. El medio de unión del antígeno se fusiona preferiblemente con un dominio intracelular a partir de una o más moléculas co-estimuladoras y una cadena zeta. Preferiblemente, el medio de unión del antígeno se fusiona con uno o más dominios intracelulares seleccionados a partir del grupo de un dominio de señalización CD137 (4-1BB), un dominio de señalización CD28, un dominio de señal CD3 zeta y cualquiera de sus combinaciones.

En una presentación, el CAR del invento comprende un dominio de señalización CD137 (4-1BB). Lo anterior se debe a que el presente invento se basa parcialmente en el descubrimiento que las respuestas de células T mediadas por CAR pueden posteriormente mejorarse con la adición de dominios co-estimuladores. Por ejemplo, la inclusión del dominio de señalización CD137 (4-

42

1BB) que tiene una actividad anti-tumoral significativamente aumentada y una persistencia in vivo de las células CAR T en comparación con una célula CAR T idéntica no se diseñan para que expresen CD137 (4-1BB).

Composición

El presente invento proporciona un receptor antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio extracelular e intracelular. El dominio extracelular comprende un elemento de unión específico del objetivo que se conoce además como un medio de unión con el antígeno. El dominio intracelular o más bien el dominio citoplasmico comprende una región de señalización co-estimuladora y una porción de cadena zeta. La región de señalización co-estimuladora se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula co-estimuladora. Las moléculas co-estimuladoras son moléculas de superficie celular diferentes de los receptores antígenos o de sus ligandos y se requieren para una respuesta eficiente de los linfocitos al antígeno.

Ente el dominio extracelular y el dominio transmembrana del CAR, o entre el dominio citoplasmico y el dominio transmembrana del CAR, puede incorporarse un dominio espaciador. De acuerdo con esta terminología "dominio espaciador" se refiere generalmente a un oligo-o polipeptido que funciona de manera que vincule el dominio trans-membrana al dominio celular o al dominio citoplasmico dentro de la cadena polipeptida. El dominio espaciador puede comprender hasta 300

S

aminoácidos, preferiblemente 10 a 100 aminoácidos y más preferiblemente 25 a 50 aminoácidos.

Medio de unión con el Antígeno

En una presentación, el CAR del invento comprende un elemento de unión específico del objetivo al cual se conoce como un medio de unión del antígeno. La escogencia del medio dependerá del medio del tipo y número de ligandos que definen la superficie de una célula objetivo. Por ejemplo, el dominio de unión del antígeno puede escogerse con el fin de reconocer un ligando que actúe como marcador de superficie celular en células objetivo asociadas con un estado particular de enfermedad. De esta manera los ejemplos de marcadores de superficie celular que puedan actuar como ligandos para el dominio del medio de antígeno en el CAR del invento incluyen los que se asocian con infecciones virales, bacterianas y parasíticas, enfermedades autoinmunes y células cancerígenas.

En una presentación, el CAR del invento puede diseñarse para abordar un antígeno tumoral de interés por medio de la modificación de un medio deseado de unión del antígeno que se vincule específicamente con un antígeno o con una célula tumoral. Dentro del contexto del presente invento, los términos "antígeno tumoral" o "antígeno de trastorno proliferativo" o "antígeno asociado con un desorden hiperproliferativo" se referirá a los antígenos que son comunes a los

trastornos hiperproliferativos tales como el cáncer. Los antígenos analizados en este trabajo se incluyen simplemente a manera de ejemplo. El listado no tiene por objeto ser exclusivo y los ejemplos que se proporcionan son obvios para aquellas personas conocedoras de la técnica.

Los antígenos tumorales son proteínas producidas por células tumorales que despliegan una respuesta inmune, específicamente respuestas inmunes mediadas por las células T. La selección del medio de unión del antígeno del presente invento dependerá del tipo en particular de cáncer materia del tratamiento. Los antígenos tumorales son muy conocidos en la técnica e incluyen por ejemplo un antígeno asociado con glioma, antígeno carcinoembrionario (CEA), gonadotropina corionica β -humana, alfafetoproteína (AFP), AFP reactiva a la lectina, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CA IX, transcriptasa reversa de telomerasa humana, RUI, RU2 (AS), esterasa carboxilo intestinal, mut hsp70-2, M-CSF, próstata, antígeno específico de próstata (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, P53, prostateína, PSMA, Her2/neu, survivin y telomerasa, antígeno -1 de tumor de carcinoma de próstata (PCTA-1), MAGE, ELF2M, elastasa neutrofílica, ephrinB2, CD22, factor de crecimiento de insulina (IGF)-I, IGF-II, IGF-I receptor y mesotelina.

En una presentación, el antígeno tumoral comprende uno o más epitopes de cáncer antigénico asociados con un tumor maligno. Los tumores malignos expresan una serie de proteínas que pueden servir como antígenos objetivo para ataques inmune. Estas moléculas incluyen pero sin limitarse a los antígenos

específicos del tejido tales como MART-1, tirosina y GP 100 en melanoma y fosfatasa del ácido prostático (PAP) y antígeno específico de próstata (PSA) en cáncer de próstata. Otras moléculas objetivo pertenecen al grupo de moléculas relacionadas con transformación tales como HER-2/Neu/ErbB-2 oncogeno. Sin embargo otro grupo de antígenos objetivo son los onco-fetales como el antígeno carcino-embriónico (CEA). En el linfoma de célula B la inmunoglobulina idiotipo específica del tumor constituye un antígeno real de la inmunoglobulina específica para el tumor que es única para dicho tumor en particular. Los antígenos de diferenciación de célula B tales como CD19, CD20 y CD37 son otros candidatos para los antígenos objetivo en el linfoma de célula B. Algunos de estos antígenos (CEA, HER-2, CD19, CD20, idiotipos) se han utilizado como objetivos para inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales con éxito limitado.

El tipo de antígeno tumoral al cual se hace referencia en este invento puede también ser un antígeno específico de tumor (TSA) o un antígeno asociado de tumor (TAA). Un TSA es único para las células tumorales y no ocurre en otras células del organismo. Un antígeno asociado con TAA no es único para una célula tumoral y más bien se expresa en una célula normal bajo condiciones que no pueden inducir a un estado de tolerancia inmunológica al antígeno. La expresión del antígeno en el tumor puede ocurrir bajo condiciones que le permiten al sistema inmune responder al antígeno. Los TAA pueden ser antígenos que se expresan en células normales durante el desarrollo fetal cuando el sistema inmune está inmaduro y no puede responder o puede tratarse de antígenos que están

normalmente presentes en niveles extremadamente bajos en células normales, pero que se expresan como niveles mucho más elevados en células tumorales.

Los ejemplos no limitantes de antígenos TSA o TAA incluyen los siguientes: antígenos de diferenciación tales como MART-1/MelanA (MART-1), gp100 (Pmel 17), TIROSINA, TRP-1, TRP-2 y antígenos multilínea específicos del tumor tales como MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; antígenos embrionarios sobre-expresados tales como CEA; oncógenos sobreexpresados y genes mutados de supresor del tumor tales como p53, Ras, HER-2/neu; antígenos únicos del tumor resultantes de translocaciones cromosomales; tales como BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; y antígenos virales, tales como EBVA de antígenos del virus Epstein Barr y el papiloma virus humano (HPV) con sus antígenos E6 y E7. Otros antígenos grandes basados en proteínas son TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23HI, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, beta-Catenin, CDK4, Num-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, alfa-fetoproteína, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27.29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\PI, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90\Mac-2 proteína de unión\ciclofilina C- proteína asociada, TAAL6, TAG72, TLP y TPS.

En una presentación preferida, la porción del medio de unión del antígeno para el CAR se enfoca en un antígeno que incluye pero sin limitarse al CD19, CD20,

19

CD22, RORI, Mesotelina, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, Glicolipido F77, EGFRvIII, GD-2, MY-ESO-1 TCR, MAGE A3 y similares.

De acuerdo con el antígeno deseado que se va a abordar, el CAR del invento se puede diseñar para incluir el medio de unión del antígeno apropiado que sea específico para el objetivo deseado del antígeno. Por ejemplo, si CD19 es el antígeno deseado que debe abordarse, se puede utilizar un anticuerpo para CD19 como medio de unión del antígeno para incorporación al CAR del invento.

En una presentación, el medio de unión del antígeno en su porción del CAR del invento se enfoca en CD19. Preferiblemente, la porción del medio de unión del antígeno en el CAR del invento es anti-CD19 scFV, donde la secuencia del ácido nucleico del anti-CD19 scFV comprende la secuencia establecida en CEQ ID: 14. En una presentación, el anti-CD19 scFV comprende la secuencia del ácido nucleico que codifica la secuencia del aminoácido de SEQ ID No.; 20. En otra presentación, la porción anti-CD19 scFV del CAR del invento comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID No.:20.

Dominio de Transmembrana

Con respecto del dominio de transmembrana, el CAR se puede diseñar para que comprenda un dominio de transmembrana que se fusiona con el dominio extracelular del CAR. En una presentación, el dominio de transmembrana que se

asocia en forma natural con uno de los dominios en el CAR que es el que se utiliza para estos propósitos. En algunos casos, el dominio de transmembrana se puede seleccionar o modificar mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de tales dominios con los dominios de transmembrana de las mismas o distintas proteínas de membrana de superficie con el objeto de minimizar las interacciones con otras membranas del complejo receptor.

El dominio de transmembrana se puede derivar de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio se puede derivar a partir de una proteína unida a la membrana o de la transmembrana. Las regiones de transmembrana de uso particular en este invento se pueden derivar (por ejemplo de por lo menos las regiones de transmembrana) de la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. De manera alterna el dominio de transmembrana puede ser sintético, caso en el cual comprenderá esencialmente residuos hidrofóbicos tales como leucina y valina. Preferiblemente se encontrará una tripleta de fenilalanina, triptofan y valina en cada extremo de un dominio de transmembrana sintética. Opcionalmente, una unión corta oligo-o polipeptida, preferiblemente entre 2 y 10 aminoácidos de longitud podrán formar el enlace entre el dominio de transmembrana y el dominio de señalización citoplasmica del CAR. Una pareja glicina-serina proporcionara un elemento particularmente adecuado de unión.

3

Preferiblemente, el dominio de transmembrana en el CAR del invento es el de transmembrana CD8. En una presentación, el dominio transmembrana CD8 comprende la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID No.: 16. En una presentación, el dominio de transmembrana CD8 comprende la secuencia del ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.: 22. En otra presentación, el dominio transmembrana CD8 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 22.

En algunos casos, el dominio de transmembrana del CAR para el invento comprende el dominio de unión CD8 α . En una presentación, el dominio de vinculación CD8 comprende la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID No.: 15. En una presentación, el dominio de vinculación CD8 comprende la secuencia del ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.: 21. En otra presentación, el dominio de vinculación CD8 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.: 21.

Dominio Citoplasmico

El dominio citoplasmico o más bien el dominio de señalización intracelular del CAR del invento es el responsable de la activación de por lo menos una de las funciones normales del efector para la célula inmune en donde el CAR se coloca. El término "función de efector" se refiere a una función especializada de una célula. La función de efector de una célula T, por ejemplo, puede ser la actividad

69

citolítica o la actividad de ayuda que incluye la secreción de las citoquinas. Así las cosas el término "dominio de señalización intracelular" se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de función del efector y dirige la célula para ejecutar una función especializada. Si bien en términos generales el dominio de señalización intracelular total puede utilizarse, en muchos casos no es necesario emplear la cadena completa. En la medida en que se utilice una porción truncada del dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada puede emplearse en lugar de la cadena intacta siempre y cuando haga la transducción de la señal de función del efector. El término dominio de señalización intracelular tiene entonces el significado de incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función del efector.

Los ejemplos preferidos de dominios de señalización intracelulares para utilizarlos en el CAR de este invento son entre otros las secuencias citoplasmáticas del receptor de celular T (TCR) y los correceptores que actúan coordinadamente para iniciar la transducción de señal luego de un enganche del receptor de antígenos, al igual de lo que sucede con los derivados o variantes de estas secuencias y de cualquier secuencia sintética que desempeñe la misma capacidad funcional.

Se sabe que las señales generadas a través del TCR solamente son insuficientes para la plena activación de las células T y que se requiere por lo tanto una señal secundaria o co-estimuladora. Así las cosas, la activación de la célula T estará

5

mediada por dos clases diferenciadas de secuencias de señalización citoplasmica: aquellas que inician la activación primaria dependiente del antígeno a través del TCR (secuencias primarias de señalización citoplasmica) y las que actúan de manera independiente del antígeno para lograr una señal secundaria o co-estimuladora (secuencia secundaria de señalización citoplasmica).

Las secuencias primarias de señalización citoplasmica regulan la activación primaria del complejo TCR bien sea de manera estimuladora o inhibitoria. Las secuencias primarias de señalización citoplasmica que actúan en forma estimuladora pueden contener motifs de señalización que son conocidos como motifs de activación basados en tirosina inmuno-receptora o ITAMs.

Entre los ejemplos de las secuencias del ITAM que contienen señalización primaria citoplasmica y que son de uso particular en el presente invento están las que se derivan TCR zeta, FeR gamma, FeR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. Se prefiere de manera especial que la molécula de señalización citoplasmica en el CAR para el presente invento comprenda una secuencia de señalización citoplasmica derivada de CD3 zeta.

En una presentación preferida, el dominio citoplasmico del CAR se puede diseñar de manera que comprenda el dominio de señalización CD3 zeta por sí mismo o en combinación con cualquier otro dominio o dominios citoplasmicos deseados útiles dentro del contexto del CAR del presente invento. Por ejemplo, el dominio

citoplasmico del CAR puede comprender una porción CD3 zeta de cadena y una región de señalización co-estimuladora. La región de señalización co-estimuladora se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula co-estimuladora. La molécula co-estimuladora es de superficie celular diferente del receptor antígeno o de sus ligandos y se requiere para lograr una respuesta eficaz de linfocitos al antígeno. Entre los ejemplos de dicha molécula están CD27, CD28, 4-1BB, (CD137) OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno-1 asociado con la función linfocítico (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y un ligando que se une específicamente con CD83, y similares. De esta forma, si bien el invento se ejemplifica esencialmente con 4-1BB como elemento de señalización co-estimuladora, existen otros elementos de esta misma naturaleza que están dentro del alcance del presente invento.

Las secuencias de señalización citoplasmica al interior de la porción de señalización citoplasmica del CAR del invento se pueden conectar entre sí en forma aleatoria o siguiendo un orden específico. Opcionalmente, un enlace coro oligo o polipéptido preferiblemente entre 2 y 10 aminoácidos de longitud pueden formar el vínculo. La pareja glicina-serina proporciona un vínculo especialmente adecuado.

En una presentación, el dominio citoplasmico está diseñado para que comprenda el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28. En otra presentación, el dominio citoplasmico está diseñado para que comprenda

el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB. En otra presentación todavía, el dominio citoplasmico está diseñado para que comprenda el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28 y 4-1 BB.

Según otra presentación, el dominio citoplasmico en el CAR del invento está diseñado para que comprenda el dominio de señalización de 4-1 BB y el dominio de señalización de CD3-zeta, donde el dominio de señalización 4-1 BB comprende la secuencia del acido nucléico establecida en SEQ ID No.: 17 y el dominio de señalización de CD3-zeta comprende la secuencia del acido nucléico establecida en SEQ ID No.: 18.

En otra presentación, el dominio citoplasmico del CAR en el invento está diseñado para que comprenda el dominio de señalización de 4-1 BB y el dominio de señalización de CD3-zeta, donde el dominio de señalización de 4-1 BB comprende la secuencia del acido nucléico que codifica la secuencia del aminoácido SEQ ID No.: 23 y el dominio de señalización de CD3-zeta comprende la secuencia del acido nucléico que codifica la secuencia del aminoácido SEQ ID No.:24

En otra presentación mas, el dominio citoplasmico del CAR del invento está diseñado para que comprenda el dominio de señalización de 4-1 BB y el dominio de señalización de CD3-zeta, en donde el dominio de señalización de 4-1 BB comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID No.:23 y el

99

dominio de señalización de CD3-zeta comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID No.:24.

Vectores

El presente invento comprende un constructo ADN conformado por secuencias de un CAR, donde dicha secuencia está conformada por la secuencia del ácido nucleico de un medio de unión del antígeno que se vincula en forma operacional con la secuencia de un ácido nucleico de un dominio intracelular. Un dominio intracelular ejemplar que se puede utilizar en el CAR del invento incluye pero sin limitarse al dominio intracelular de CD3-zeta, CD28, 4-1BB y similares. En algunos casos, el CAR puede comprender cualquier combinación de CD3-zeta CD28, 4-1 BB y similares.

En una presentación, el CAR del invento comprende uniones anti-CD19 scFv, CD8 humano y dominio de transmembrana y dominios humanos 4-1 BB y CD3 zeta para señalización. En una presentación, el CAR del invento comprende la secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID No.: 8. En otra presentación, el CAR del invento comprende la secuencia del ácido nucleico que codifica la secuencia del aminoácido de SEQ ID No.: 12. Según otra presentación, el CAR del invento comprende la secuencia del aminoácido establecida en SEQ ID No.:12.

Las secuencias del ácido nucleico que se codifican para las moléculas deseadas pueden obtenerse utilizando métodos recombinantes conocidos en la técnica, como son por ejemplo la búsqueda en librerías a partir de células que expresan el gen, derivando el gen a partir de un vector conocido para incluir los mismos, o aislándolos directamente de las células y tejidos que los contengan aplicando técnicas estándar. De manera alterna, el gen de interés puede producirse sintéticamente en lugar de clonarse.

El presente invento proporciona además vectores en los cuales un ADN del presente invento se inserta. Los vectores derivados de retrovirus tales como el lentivirus constituyen herramientas adecuadas para lograr la transferencia de genes a largo plazo puesto que permiten una integración estable a largo plazo de un transgen y su programación en las células hijas. Los vectores lentivirales tienen la ventaja adicional sobre vectores derivados de onco-retrovirus como los virus de la leucemia murine en cuanto a que pueden transducir células no proliferantes, como los hepatocitos. Igualmente tienen la ventaja adicional de baja inmunogenicidad.

En un corto resumen, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican los CARs se logran básicamente mediante la vinculación operacional de un ácido nucleico que codifica el polipeptido CAR o sus porciones con un promotor, y que luego incorpora el constructo dentro de un vector de expresión. Los vectores pueden ser adecuados para replicación e integración de eucariotas.

20

Los vectores típicos de clonado contienen terminadores de transcripción y traslado, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión de la secuencia deseada del ácido nucleico.

La expresión constructo que se utiliza en el presente invento puede también emplearse para inmunización del ácido nucleico y terapia genética, aplicando la entrega estándar de genes en protocolos. Los métodos para la aplicación de genes se conocen en la técnica. Ver por ejemplo las patentes de los Estados Unidos Nos. 5, 399, 346, 5, 580, 859, 5, 589, 466 que se incorporan a este documento a manera de referencia en forma total. Según otra presentación, el invento proporciona un vector para terapia genética.

El ácido nucleico se puede clonar en una serie de tipos de vectores. Por ejemplo, el ácido nucleico puede clonarse en un vector que incluya pero no se limite a un derivado plasmido, fagemido, fago, virus animal y cosmido. Los vectores de interés en particular incluyen vectores de expresión, de replicación, de generación de sonda y vectores de secuenciamiento.

Además de lo anterior, el vector de expresión puede aportarse a una célula en la forma de vector viral. La tecnología de vector viral es muy conocida en la técnica y se describe por ejemplo en Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning; A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, New York) y en otros manuales de virología y biología molecular. Los virus que son útiles como vectores son

entre otros los retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes y lentivirus. En términos generales, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional por lo menos en un organismo, una secuencia promotora, sitios convenientes para endonucleasa de restricción y uno o más marcadores seleccionables (ejemplo WO 01/96584; WO 01/29058; y U.S.Pat. no. 6, 326,193).

Una serie de sistemas basados en virus se han desarrollado para lograr la transferencia de genes hacia las células mamarias. Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma adecuada para los sistemas de descarga de genes. Un gen seleccionado se puede insertar dentro de un vector y un paquete en artículos retrovirales empleando las técnicas conocidas en este campo del conocimiento. El virus recombinante puede luego aislarse y pasarse luego hacia las células del sujeto bien sea in vivo o ex vivo. Se conoce una serie de sistemas retrovirales en la técnica. En algunas presentaciones, se utilizan los vectores adenovirus. Se conoce una serie de vectores adenovirus en la técnica y en una presentación se emplean los vectores lentivirus.

Existen algunos elementos promotores adicionales como mejoradores, que regulan la frecuencia de iniciación transcripcional. Básicamente, estos elementos se ubican en la región 30 – 110 bp hacia arriba del sitio de inicio, aun cuando una serie de promotores hubiesen demostrado recientemente que contienen elementos funcionales en sentido descendente con respecto del sitio de inicio. El espaciamiento entre los elementos promotores es flexible frecuentemente, de tal

manera que la función de promoción se preserva cuando los elementos son invertidos o movidos en relación de uno al otro. Para el caso del promotor de la quinasa timidina (tk) el espaciamiento entre los elementos promotores se puede aumentar hasta 50 bp de separación antes de que empiece a declinar la actividad. De acuerdo con el promotor, se observa que los elementos individuales pueden funcionar bien sea de manera cooperada o independiente para activar la transcripción.

Un ejemplo de un promotor adecuado es la secuencia promotora citomegalovirus temprana e inmediata (CMV). Esta secuencia promotora es un fuerte constitutivo capaz de accionar altos niveles de expresión de una secuencia polinucleotida que se vincule operacionalmente a esta operación. Otro ejemplo de un promotor adecuado es el Factor de Crecimiento de Elongación -1 α (EF-1 α). Sin embargo, se pueden también utilizar otras frecuencias promotoras constitutivas, incluyendo pero sin limitarse al promotor temprano del virus del simio 40 (SV40), el virus de tumores mamarios de ratas machos (MMTV), el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el promotor de repetición terminal larga (LTR), el promotor MoMuLV, el promotor del virus de leucemia aviar, el promotor temprano e inmediato del virus Epstein-Barr, el promotor del virus de sarcoma Rous, al igual que los promotores del gen humano como son entre otros el promotor actin, el promotor miosin, el promotor de hemoglobina y el promotor de la quinasa creatina. Por otra parte, el invento no debe limitarse al uso de promotores constitutivos. Los promotores inducibles también se contemplan como parte del presente invento. El

uso de un promotor inducible proporciona un interruptor molecular capaz de desencadenar una expresión de la secuencia polinucleótida que se une operacionalmente cuando dicha expresión se requiera, o bien desactiva la expresión cuando esta ya no se necesita. Entre los ejemplos de los promotores inducibles están el promotor metalotionina, el glucocorticoide, el del progesterona y un promotor de tetraciclina.

Con el propósito de evaluar la expresión de un polipeptido CAR o porciones del mismo, el vector de expresión que deba introducirse al interior de una célula puede además contener un gen marcador seleccionable o un gen reportero o ambos para facilitar la identificación y selección de células de expresión a partir de la población de células que deban ser transferidas o infectadas a través de vectores virales. En otros aspectos, el marcador seleccionable puede transportarse en un elemento separado del ADN y utilizado en procedimientos de co-transfecciones. Ambos marcadores seleccionables y genes de reportes pueden proveerse de secuencias regulatorias apropiadas para permitir la expresión en las células huésped. Los marcadores seleccionables útiles son por ejemplo los genes resistentes a antibióticos tales como el neo y similares.

Los genes reporteros se utilizan para identificar células potencialmente transfectadas y para evaluar la funcionalidad de secuencias regulatorias. En general, un gen reportero es aquel que no está presente ni se expresa por parte del organismo o tejido receptor y que codifica un polipéptido cuya expresión se

72

manifiesta mediante ciertas propiedades fácilmente detectables como es la actividad enzimática. La expresión del gen reportero se ensaya en un momento adecuado después que el ADN hubiese sido introducido a las células receptoras. Los genes reporteros adecuados pueden incluir los genes que codifican la luciferasa, beta-galactosidasa, cloramfenicol acetil transferasa, fosfatasa alcalina secretada o gen de proteína fluorescente verde (por ejemplo, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79 – 82). Los sistemas adecuados de expresión son muy conocidos y se pueden elaborar aplicando técnicas conocidas o aquellas obtenidas a nivel comercial. En general, el constructo con la región mínima de flanco de 5' que muestra el nivel más elevado de expresión del gen reportero se identifica como promotor. Dichas regiones promotoras pueden unirse a un gen reportero y utilizarse para evaluar agentes para lograr la capacidad de modular la transcripción accionada por el promotor.

Los métodos para introducir y expresar genes dentro de una célula son conocidos en la técnica. Dentro del contexto de un vector de expresión, este puede rápidamente introducirse en una célula huésped, por ejemplo mamaria, bacterial, de moho o insecto mediante uno de los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el vector de expresión se puede transferir al interior de una célula huésped por acción física, química o biológica.

Los métodos físicos para introducir un polinucleótido dentro de una célula huésped son entre otros la precipitación de fosfato cálcico, la lipofección, bombardeo de

56

partículas, microinyección, electroporación y similares. Los métodos para producir células que comprendan vectores y/o ácidos nucleicos exógenos se conocen perfectamente en la técnica. Consultar por ejemplo Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Un método preferido para la introducción de un polinucleótido dentro de una célula huésped es la transfección de fosfato cálcico.

Los métodos biológicos para introducir un polinucleótido de interés dentro de una célula huésped son entre otros el uso de ADN y vectores ARN. Los vectores virales y especialmente los retrovirales, se han convertido en el método más ampliamente utilizados para insertar genes dentro de células mamarias, por ejemplo las humanas. Se pueden derivar otros vectores virales a partir del lentivirus, poxvirus, virus del herpes simple I, adenovirus y virus asociados al adeno y similares. Consultar por ejemplo U.S. Pat. Nos. 5, 350,674 y 5, 585,362.

Los medios químicos para introducir un polinucleótido dentro de una célula huésped son entre otros los sistemas de dispersión coloidal, como los complejos macromoleculares, monocápsulas, microesferas y sistemas basados en lípidos entre los cuales están las emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mezclados y liposomas. Un sistema coloidal ejemplar para utilizarlo como vehículo de entrega in vitro e in vivo es una liposoma (puede ser una vesícula de membrana artificial).

of

En el caso en el que se utilice un sistema de descarga no viral, el vehículo ejemplar para este caso es un liposoma. El uso de formulaciones lipídicas se contempla para la introducción de los ácidos nucleicos dentro de la célula huésped (in vitro, ex vivo o in vivo). En otro aspecto, el ácido nucleico se puede asociar como un lípido. El ácido nucleico asociado con un lípido puede encapsularse en el interior acuoso de un liposoma, interdispersado al interior de la capa doble de lípido en un liposoma, adheriéndose a un liposoma por medio de una molécula de unión que se asocie con el liposoma y el oligonucleótido, atrapándose en un liposoma, haciendo complejo con liposoma, dispersándose en una solución que contenga un lípido, mezclándose con un lípido, combinándose con un lípido, conteniéndose como una suspensión dentro de un lípido, conteniéndose o complejarse con un micela, o de alguna otra manera asociándose con un lípido. El lípido, Lípido/ADN o vector de lípido/expresión que se asocian a composiciones no se limitan a ninguna estructura en particular de la solución. Por ejemplo, pueden estar presentes en una estructura de capa doble, como micelas o con una estructura "colapsada". Igualmente pueden diseminarse dentro de una solución, formando posiblemente agregados que no sean uniformes en cuanto a tamaño o forma. Los lípidos son sustancias grasas que pueden ocurrir en forma natural o a manera de lípidos sintéticos. Por ejemplo, los lípidos incluyen las gotas grasas que ocurren en forma natural en el citoplasma al igual que la clase de compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados, como ácidos grasos, alcoholes, aminos, amino-alcoholes y aldehídos.

Los lípidos que pueden utilizarse se obtienen de fuentes comerciales. Por ejemplo, se puede obtener el fosfatidilcolina dimiristi ("DMPC") de Sigma, ST. Louis, MO; el dicetil fosfato ("DCP") se puede obtener de K & K Laboratorios (Plainview, NY); el colesterol ("Chol") puede obtenerse en Calbiochem – Behring; el fosfatidilglicerol dimiristil ("DMPG") y otros lípidos se pueden obtener en Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL). Las soluciones Stock de lípidos en cloroformo o cloroformo/metanol se pueden almacenar a una temperatura elevada de -20° C. El Cloroformo se utiliza como el único solvente ya que se evapora más fácilmente que el metano. El "Liposoma" es un término genérico que comprende una serie de vehículos lípidos sencillos y multilaminares formados por la generación de capas dobles lipidas encerradas o agregados. Los liposomas se pueden caracterizar como aquellos que tienen estructuras vesiculares con una membrana de dos capas de fosfolipidos y un medio interno acuoso. Los liposomas multilaminares tienen capas de lípidos separadas por un medio acuoso. Estas se forman espontáneamente cuando se suspenden los fosfolipidos en un exceso de solución acuosa. Los componentes lípidos se someten a un auto-reagrupamiento antes de la formación de estructuras cerradas y agua atrapada y solutos disueltos entre las capas dobles del lípido (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505 – 10). Sin embargo, las composiciones que tienen estructuras en solución diferente de las estructuras vesiculares normales también se incluyen en esta actividad. Por ejemplo, los lípidos pueden asumir una estructura micelar o sencillamente existir como agregados no uniformes de moléculas de lípidos. Se contemplan también los complejos conformados por lipofectamina-acido nucléico.

00
X

Independientemente del método utilizado para introducir ácidos nucleicos exógenos dentro de una célula huésped o exponer de otra manera una célula al inhibidor del presente invento, para confirmar la presencia de la secuencia ADN recombinante en la célula huésped, se puede llevar a cabo una serie de ensayos, los cuales incluyen por ejemplo, los de "Biología Molecular" muy bien conocidos entre los expertos en esta campo, tales como Southern y Northern blotting, RT-PCR y PCR; ciertos ensayos "bioquímicos" como detectar la presencia o ausencia de un péptido particular, por ejemplo utilizando medios inmunológicos (ELISA y Western blots) o aplicando ensayos descritos en este documento para identificar agentes que puedan ubicarse dentro del alcance de este invento.

Fuentes de células T

Antes de la expansión y modificación genética de las células T del invento, se obtiene una fuente de células T a partir de un sujeto. Se pueden obtener células T de una serie de fuentes, que incluyen células mononucleares de sangre periférica, medula ósea, tejido de nodo linfático, sangre del cordón, tejido del timo, tejido proveniente de un sitio de infección, ascitos, efusión pleural, tejido de vejiga y tumores. En algunas presentaciones de este invento, cualquier número de líneas de células T disponibles en la técnica podrán utilizarse y en ciertas presentaciones de este invento, se pueden obtener las células T a partir de una unidad de sangre recolectada de un sujeto aplicando una serie de técnicas conocidas entre los

10x

expertos, tales como la separación Ficoll™. En una presentación preferida, las células provenientes del torrente circulatorio de un individuo se obtienen mediante aféresis. El producto aféresis contiene básicamente linfocitos, que incluyen células T, monocitos, granulocitos, células B, otras células de glóbulos blancos nucleadas, células de glóbulos rojos y plaquetas. En una presentación, las células recolectadas mediante aféresis pueden lavarse para retirar la fracción del plasma y colocar luego las células en un buffer apropiado o medios para realizar los pasos posteriores de procesamiento. Según una presentación del invento, las células son lavadas con solución salina bufferada en fosfato (PBS). En una presentación alterna, a la solución de lavado le falta calcio y puede incluso faltarle magnesio y muchos por no decir todos los cationes divalentes. Nuevamente sorprende la serie de pasos iniciales de activación en ausencia del calcio lo cual conduce a una activación aumentada. Como podrían observar las personas expertas en este campo un paso de lavado puede aplicarse mediante los métodos conocidos en la técnica, como puede ser la utilización de un equipo de centrifugado semi-automático "flow – through" (por ejemplo, el procesador de células Cobe 2991, el Baxter CytoMate o el Haemonetics Cell Saber 5) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después del lavado, las células pueden re-suspenderse en una serie de buffers bio-compatibles que pueden ser por ejemplo, Ca^{2+} -free, Mg^{2+} -free PBS, Plasma Lyte A, o cualquier otra solución salina con buffer o sin este. De manera alterna, los componentes no deseables de la muestra de aféresis pueden retirarse y las células re-suspenderse directamente en medios de cultivo.



En otra presentación, las células T se aíslan de los linfocitos de sangre periférica haciendo lisado de las células de los glóbulos rojos y agotando por ejemplo los monocitos, mediante centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™ o mediante elutriación centrífuga de contraflujo. Una sub-población específica de células T, como CD3⁺, CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ y CD45RO⁺ puede aislarse posteriormente mediante la aplicación de técnicas de selección positiva o negativa. Por ejemplo, en una de las presentaciones, las células T se aíslan mediante incubación utilizando esferas conjugadas anti-CD3/anti-CD28 (es decir 3 x 28), tales como DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, por un periodo de tiempo suficiente para lograr la selección positiva de las células T deseadas. Según una presentación, el periodo de tiempo es de aproximadamente 30 minutos. En otra presentación adicional, el periodo de tiempo va desde 30 minutos hasta 36 horas o más y todos los valores integrales intermedios. En una presentación adicional, el periodo de tiempo es por lo menos de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. En otra presentación preferida el periodo de tiempo es de 10 a 24 horas. En una presentación preferida, el tiempo de incubación es de 24 horas. Para lograr el aislamiento de las células T con respecto de pacientes que tienen leucemia, el uso de tiempos más prolongados de incubación tal como 24 horas, pueden incrementar la producción celular. Los tiempos de incubación mayores pueden utilizarse con el fin de aislar las células T en cualquier situación en las cuales existan pocas células T en comparación con otros tipos celulares, como es el caso de aislar los linfocitos de infiltración tumoral (TIL) desde un tejido tumoral o desde individuos inmunocomprometidos. Por otra parte, el uso de tiempos mayores de incubación podrá

19

incrementar la eficiencia de captura de la célula CD8+ T. Así las cosas, mediante la reducción o alargamiento simple de las células T en el tiempo se puede hacer la unión con la esfera CD3/CD28 y/o aumentando o disminuyendo la proporción de esferas con respecto de las células T (según se describe más adelante en este mismo documento), las sub-poblaciones de las células T pueden seleccionarse preferencialmente a favor o en contra en la iniciación de cultivos o en cualquier otro punto del tiempo durante el proceso. Adicionalmente, al aumentarse o disminuirse la proporción de anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 en las esferas u otra superficie, las sub-poblaciones de células T se pueden seleccionar preferencialmente a favor o en contra en el inicio de cultivos o en otros puntos deseados del tiempo. El experto podría reconocer que se pueden emplear múltiples rondas de selección dentro del contexto de este invento. En algunas presentaciones, resulta deseable realizar el procedimiento de selección y utilizar las células "no seleccionadas" dentro de la activación y proceso de expansión. Las células "No seleccionadas" pueden también someterse a rondas posteriores de selección.

El enriquecimiento de una población de células T mediante selección negativa puede lograrse mediante una combinación de anticuerpos dirigidos hacia marcadores de superficie únicos para las células negativamente seleccionadas. Uno de los métodos es la clasificación celular y/o selección vía inmuno-adherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza un coctel de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia marcadores de superficie celular presentes en las

2

células negativamente seleccionadas. Por ejemplo, para el enriquecimiento de las CD4⁺ mediante selección negativa, un coctel monoclonal de anticuerpos incluye anticuerpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, y CD8. En ciertas presentaciones, puede ser deseable enriquecer o seleccionar positivamente células regulatorias T que básicamente expresen CD4⁺, CD25⁺, CD62L^{hi}, GITR⁺, y FoxP3⁺. En forma alterna, en ciertas presentaciones, las células regulatorias T se agotan mediante esferas conjugadas anti-CD25 o aplicando otro método similar de selección.

Para el aislamiento de una población deseada de células mediante selección positiva o negativa, la concentración de células y superficie (por ejemplo ciertas partículas como las esferas) pueden variarse. En algunas presentaciones, resulta deseable disminuir significativamente el volumen en el cual las esferas y células se mezclan entre sí, (por ejemplo, incrementando la concentración de células), con el fin de garantizar el contacto máximo de células y esferas. Por ejemplo, en una presentación, se utiliza una concentración de 2 billones de células/ml. En una presentación, se emplea una concentración de 1 billón de células/ml. En presentaciones adicionales, se utilizan más de 100 millones de células/ml. En otra presentación, se utiliza una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. Sin embargo en otra presentación, se utilizo una concentración de células a partir de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. Según presentaciones adicionales, se pueden utilizar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de concentraciones elevadas puede

83

dar como resultado un incremento en la producción celular, activación celular y expansión celular. Adicionalmente, el uso de altas concentraciones celulares permite una captura más eficaz de células que pudieran expresar débilmente antígenos objetivo de interés, tales como las células CD28-negativas T o a partir de muestras en las cuales exista la presencia de numerosas células tumorales (por ejemplo sangre leucémica, tejidos tumorales, etc.). Estas poblaciones de células pueden tener un valor terapéutico y es deseable su obtención. Por ejemplo, el uso de elevadas concentraciones de células permite lograr una selección más eficaz de células CD8⁺ T que normalmente tienen una expresión más débil de CD28.

En una presentación relacionada, puede resultar deseable utilizar concentraciones menores de células. Diluyendo significativamente la mezcla de células T y la superficie (por ejemplo ciertas partículas como esferas), se minimiza las interacciones entre las partículas y las células. Este procedimiento permite seleccionar células que expresen altas cantidades de antígenos deseados que se unan a las partículas. Por ejemplo, las células CD4⁺ T expresan niveles más altos de CD28 y se capturan más eficazmente que la célula CD8⁺ T en concentraciones diluidas. Según una de las presentaciones, la concentración de células utilizadas es de 5×10^6 /ml. Según otras presentaciones, la concentración puede variar de aproximadamente 1×10^5 /ml hasta 1×10^6 /ml y asumir cualquiera de sus valores integrales intermedios.

002

Según otra presentación, las células se pueden incubar en un rotador por tiempos variados a diversas velocidades a una temperatura de 2 – 10°C o a temperatura ambiente. Las células T para estimulación también se pueden congelar luego de realizar un paso de lavado. Con el deseo de no sujetarse a la teoría, la congelación y posterior descongelación es un paso que brinda un producto más uniforme mediante la remoción de granulocitos y en cierta medida los monocitos que se encuentren en la población celular. Luego de realizar el paso de lavado que remueve el plasma y plaquetas, las células pueden suspenderse en una solución de congelación. Si bien muchas de las soluciones de congelación y sus parámetros se conocen en la técnica y resultan útiles dentro de este contexto, existe un método que implica el uso del PBS que contenga 20% DMSO y 8% de albumina del suero humano, o medios de cultivo que contengan 10% Dextran, 40 y 5% Dextrosa, 20% de Albumina del Suero Humano y 7.5% DMSO, o 31.25% Plasmalyte-A, 31.25% Dextrosa, 5%, 0.45% NaCl, 10% Dextran 40 y 5% Dextrosa, 20% Albumina del Suero Humano y 7.5% DMSO u otros medios adecuados de congelación celular que contengan por ejemplo Hespan y PlasmaLyte A, donde las células se congelan a una temperatura de -80°C y a una velocidad de 1° por minuto y se almacenan dentro de la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Se pueden utilizar otros métodos para congelación controlada como también para congelación no controlada en forma inmediata a una temperatura de -20°C o dentro de nitrógeno líquido.

28

En algunas presentaciones, las células crio preservadas se descongelan y se lavan como se describe en este documento y se les permite estar en reposo durante una hora a temperatura ambiente antes de su activación aplicando los métodos descritos en el presente invento.

Se contempla además en el contexto del invento la recolección de muestras de sangre o productos de aféresis tomados de un sujeto en un periodo de tiempo anterior al momento de expansión celular tal y como se describe en este documento en la medida de lo necesario. En estas condiciones, la fuente de las células que deba expandirse se recolecta en cualquier punto del tiempo que fuere necesario y las células deseadas tales como las células T, aisladas y congeladas para uso posterior dentro de un procedimiento de terapia celular T para cualquier número de enfermedades o condiciones que pudieren beneficiarse de la terapia con células T, tales como las que se describen en este documento.

En una de las presentaciones se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente saludable. En ciertas presentaciones, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente saludable quien se encuentre en condiciones de riesgo de desarrollar una enfermedad, pero que todavía no la hubiese desarrollado, en donde las células de interés se aíslan y se conservan para uso posterior. En algunas presentaciones, se pueden expandir las células T, luego congelarse y utilizarse posteriormente. En ciertas presentaciones, se recogen las muestras provenientes de un paciente poco tiempo después del

26

diagnostico de una enfermedad en particular tal y como se describe en este documento, pero con anterioridad al inicio de cualquier tratamiento. Según una presentación adicional, las células se aíslan de una muestra de sangre o de una afeesis a partir de un sujeto con anterioridad a una serie de modalidades pertinentes de tratamiento, incluyendo pero sin limitarse al tratamiento con ciertos agentes como natalizumab, efalizumab, agentes antivirales, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores como ciclosporin, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoablativos como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3, citoxan, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, acido micofenolico, esteroides, FR901228 e irradiación. Estos medicamentos inhiben bien sea el calcineurin fosfatasa dependiente del calcio (ciclosporina y FK506) o bien inhiben la quinasa p70S6 que es importante para el factor de crecimiento ue induce la señalización (rapamicina) (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). En una presentación adicional, las células se aíslan para un paciente y luego se congelan para uso posterior conjuntamente con (es decir antes en forma simultánea o posterior) medula ósea o trasplante de células madre, terapia ablativa de células T utilizando agentes de quimioterapia como tales, fludarabina, terapia de radiación de esfera externa (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. Según otra presentación, las células se aíslan con anterioridad y pueden congelarse para uso posterior para aplicar un tratamiento según terapia ablativa de células B tales como agentes que reaccionen al CD20, como el Rituxan.

8X

En otra presentación de este invento, se obtienen las células T a partir de un paciente directamente después del tratamiento; en esta perspectiva se ha observado que después de ciertos tratamientos para el cáncer, en particular cuando se utilizan medicamentos que afectan el sistema inmune, poco tiempo después del tratamiento durante el periodo en el cual los pacientes se podrían estar recuperando del tratamiento, la calidad de células T obtenidas puede ser optima o mejorarse para lograr una mejor capacidad de expansión ex vivo. De igual manera, después de la manipulación ex vivo aplicando los métodos descritos en este trabajo, estas células pueden encontrarse en un estado preferencial para mejora de procesos de injerto y expansión in vivo. Así las cosas, se contempla dentro del contexto de este invento recolectar células sanguíneas, incluyendo células T, células dendríticas u otras células de linaje hematopoyético, dentro de esta fase de recuperación. Por otro lado, en ciertas presentaciones, se puede utilizar la movilización, (por ejemplo, movilización con GM-CSF) y regímenes de acondicionamiento para crear una condición en un sujeto en el cual la repoblación, recirculación, regeneración y/o expansión de tipos particulares de células se favorece, especialmente durante una ventana definida de tiempo posterior a la terapia. Los tipos ilustrativos de células incluyen células T, células B, células dendríticas y otras células del sistema inmune.

Activación y Expansión de Células T



Bien sea antes o después de la modificación genética de las células T para expresar un CAR deseable, estas células se pueden activar y expandir aplicando en general los métodos descritos por ejemplo en las patentes conocidas como U. S. Patents 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041 y la publicación de solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 20060121005.

En general, las células T del invento se expanden por contacto con una superficie que tenga allí adherida un agente que estimule un complejo CD3/TCR de señal asociada y un ligando que estimule una molécula co-estimuladora sobre las superficies de las células T. en particular, se pueden estimular las poblaciones de células T como se describe aquí, mediante contacto con un anticuerpo anti-CD3, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, o mediante un anticuerpo anti-Cd2 inmovilizado sobre una superficie o por contacto con un activador de la quinasa C proteínica (por ejemplo, briostatin) junto con ionoforos cálcicos. Para la co-estimulación de una molécula accesoria sobre las superficies de células T, se utiliza un ligando que una la molécula accesoria. Por ejemplo, se puede contraer una población de células T utilizando un anticuerpo an-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, bajo condiciones apropiadas para la estimulación de proliferación de células T. Para estimular la proliferación de células T CD4⁺ o células T CD8⁺, se utilizara un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Entre los ejemplos de un anticuerpo anti-CD28 están 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diaclone, Besancon, Francia)



que se pueden utilizar al igual que otros métodos conocidos comúnmente en la técnica (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):1319-1328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

En ciertas presentaciones, la señal estimuladora primaria y la señal co-estimuladora para las células T pueden obtenerse mediante diversos protocolos. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada una de las señales pueden encontrarse en solución o acoplados a una superficie. Cuando se acoplan a una superficie, los agentes pueden unirse a la misma superficie (por ejemplo en una formación "cis") o a superficies distintas (por ejemplo en formación "trans"). De manera alterna, se puede acoplar un agente a una superficie y el otro agente estará en solución. Según una presentación, que el agente que proporcione la señal co-estimuladora se unirá a una superficie celular y el agente que proporcione la señal de activación primaria estará en solución o se acopla a una superficie. En algunas presentaciones, ambos agentes pueden encontrarse en solución. Según otra presentación, los agentes pueden estar en forma de solución y luego unirse transversalmente a una superficie, como una célula que exprese receptores Fc o un anticuerpo o cualquier agente de unión que se una a los agentes. En este contexto, consultar por ejemplo las publicaciones de solicitudes de patente de los Estados Unidos Nos. 20040101519 y 20060034810 con respecto de células que presentan antígenos artificiales (aAPCs) cuyo uso se contempla para activar y expandir las células T en el presente invento.

20

En una de las presentaciones, los dos agentes son inmovilizados sobre esferas, bien sea en la misma esfera como "cis" o en esferas separadas como en "trans". A manera de ejemplo, el agente que proporciona la señal primaria de activación es un anticuerpo anti-CD3 o bien un fragmento del mismo de unión del antígeno en tanto que el agente que proporciona la señal co-estimuladora es un anticuerpo anti-CD28 o bien uno de sus fragmentos de unión al antígeno; y ambos agentes quedan co-inmovilizados en la misma esfera en cantidades moleculares equivalentes. Según una presentación, se utiliza una proporción 1:1 de cada anticuerpo unido a las esferas para expansión celular $CD4^+$ T y crecimiento celular T. En ciertos aspectos de este invento, se utiliza una proporción de anticuerpos anti-CD3:CD28 unidos a las esferas de tal manera que se observa un incremento en la expansión de células T en comparación con la expansión que se detecta utilizando una proporción de 1:1. En una presentación en particular se observa un incremento a partir de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 3 veces en comparación con la expansión observada utilizando una proporción de 1:1. Según una presentación, la proporción de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las esferas estarán en un rango desde 100:1 hasta 1:100 y todos sus valores integrales intermedios. Según un aspecto de este invento, más anticuerpos anti-CD28 se unen a las partículas que los anticuerpos anti-CD3, es decir la proporción de CD3:CD28 es inferior a uno. Según ciertas presentaciones del invento, la proporción del anticuerpo, CD28 con respecto del anticuerpo anti-CD3 unidos a

91

las esferas es superior a 2:1. Según una presentación en particular, se utiliza una proporción 1:100 CD3:CD28 de anticuerpos unidos a la esfera.

Según otra presentación, se utiliza una proporción 1:75 CD3:CD28 de anticuerpos unidos a la esfera.

En una presentación adicional, se utiliza una proporción 1:50 CD3:CD28 de anticuerpos unidos a las esferas.

En otra presentación, una proporción 1:30 CD3:CD28 de anticuerpo unido a las esferas es lo utilizado.

En otra presentación preferida, se utiliza una proporción 1:10 CD3:CD28 de anticuerpos unidos a esferas.

En otra presentación, se utiliza una proporción 1:3 CD3:CD28 de anticuerpos unidos a las esferas.

En otra presentación más, se utiliza una proporción 3:1 CD3:CD28 de anticuerpos unidos a las esferas.

Las proporciones de partículas a células desde 1:500 hasta 500:1 y sus valores integrales intermedios pueden utilizarse para estimular células T u otras células objetivo. Según lo pueden apreciar las personas expertas en este campo del conocimiento, la proporción entre partículas y células puede depender del tamaño de las partículas en relación con las células blanco. Por ejemplo, las esferas de tamaño pequeño podrían unirse únicamente a unas cuantas células, en tanto que las esferas de mayor tamaño podrían unirse a muchas células. En ciertas presentaciones la proporción entre células y partículas se ubica en un rango desde

012

1:100 hasta 100:1 y en cualquiera de sus valores intermedios y en otras presentaciones la proporción comprende 1:9 hasta 9:1 y cualquiera de sus valores integrales intermedios, pueden ser utilizados para estimular las células T. la proporción de partículas anti-CD3 y partículas acopladas anti-CD28 con respecto de las células T que produzcan una estimulación de células T podrá variar de acuerdo con lo señalado anteriormente, sin embargo, ciertos valores preferidos incluyen 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 y 15:1 con una proporción preferida que se ubica por lo menos en una relación de 1:1 de partículas por célula T. Según una presentación, se utiliza una proporción de partículas a células de 1:1 o menos. En una presentación en particular, una proporción de partículas a células es de 1:5. En las presentaciones posteriores, la proporción de partículas a células puede variar de acuerdo con el día de estimulación. Por ejemplo, en una presentación, la proporción de partículas a células va de 1:1 hasta 10:1 el primer día y se adicionan otras partículas más a las células cada día o día de por medio de allí en adelante hasta completar 10 días y lograr proporciones finales desde 1:1 hasta 1:10 (de acuerdo con los conteos celulares que se registren el día de adición). Según una presentación en particular, la proporción de partículas a células es de 1:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:5 el tercero y quinto día de estimulación. Según otra presentación, las partículas se adicionan diariamente o cada tercer día hasta alcanzar una proporción final de 1:1 el primer día y de 1:5 el tercero y quinto día de estimulación. En otra presentación, la proporción de partículas a células es de 2:1 el primer día de estimulación y se

23

ajusta a 1:10 el tercero y quinto día de estimulación. Según otra presentación, las partículas se adicionan diariamente o día de por medio hasta alcanzar una proporción final de 1:1 el primer día, y de 1:10 el tercero y quinto día de estimulación. Una persona experta en el tema observara que otras proporciones pueden ser adecuadas en el presente invento. En particular, las proporciones variarán de acuerdo con el tamaño de partículas y según el tamaño y tipo de células.

En presentaciones adicionales del presente invento, las células como las del tipo T, se combinan con esferas recubiertas con el agente, y las esferas y células se separan posteriormente, y luego se hace el cultivo celular. Según una presentación alterna, antes del cultivo, las esferas recubiertas con el agente y las células no se separan sino que se cultivan conjuntamente. En una presentación adicional, las esferas y células se concentran en primer término mediante aplicación de una fuerza, que puede ser una fuerza magnética, que produce un aumento de ligación de marcadores de superficie celular, induciendo de esta manera la estimulación celular.

A manera de ejemplo, las proteínas de superficie celular se pueden ligar permitiendo que las esferas paramagnéticas a las cuales se unen los anti-CD3 y anti-CD28 (esferas 3 x 28) para hacer un contacto con las células T. En otra presentación las células (por ejemplo, células 10^4 hasta 10^9 T) y las esferas (por ejemplo las esferas paramagnéticas DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T en una

du

proporción de 1:1) se combinan en un buffer, preferiblemente PBS (sin cationes divalentes tales como calcio y magnesio). Nuevamente, las personas expertas en la materia pueden apreciar que se puede utilizar cualquier concentración celular. Por ejemplo, la célula blanco puede ser muy escasa en la muestra y comprender tan solo 0.01% de la muestra o bien en toda la muestra (es decir 100%) puede comprender la célula blanco de interés. En este orden de ideas, cualquier número celular se ubica dentro del contexto del presente invento. En ciertas presentaciones, resulta deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclen las partículas y células conjuntamente (es decir, incrementando la concentración celular), con el objeto de garantizar el máximo contacto de células con partículas. Por ejemplo, en una de las presentaciones se utiliza una concentración de aproximadamente 2 billones de células/ml. Según otra presentación, se utiliza un número superior a 100 millones de células/ml. En otra presentación más, se utiliza una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. Todavía en una presentación más, se utiliza una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En otras presentaciones, se pueden utilizar concentraciones de 125 ó 150 millones de células/ml. Al utilizar elevadas concentraciones se puede obtener un incremento en producción celular, activación de las mismas y expansión celular. Adicionalmente, el uso de altas concentraciones celulares permite una captura más eficiente de células que pudieren expresar débilmente los antígenos blanco de interés, tales como las células T negativa CD28. Estas poblaciones de células pueden tener un valor terapéutico y sería deseable obtenerlas en ciertas

06

presentaciones. Por ejemplo, utilizando altas concentraciones de células se logra una selección más eficiente de célula CD8⁺ T que normalmente tiene una expresión CD28 más débil.

Según una presentación de este invento, la mezcla puede cultivarse durante varias horas (aproximadamente 3 horas) hasta 14 días aproximadamente o cualquiera de sus valores horarios integrales intermedios. Según otra presentación, la muestra puede cultivarse durante 21 días. En una de las presentaciones del invento las esferas y las células T se cultivan conjuntamente durante 8 días aproximadamente. Según otra presentación, las esferas y las células T se cultivan conjuntamente durante 2 – 3 días. Pueden resultar deseables varios ciclos de estimulación tales como el tiempo de cultivo de células T que puede ser de 60 días o más. Las condiciones apropiadas para el cultivo de células T incluyen medios adecuados (por ejemplo, medios esenciales mínimos o medios RPMI 1640 o X-vivo 15, (Lonza)) que pueden contener factores necesarios para proliferación y viabilidad, incluyendo el suero (por ejemplo suero bovino fetal o humano), interleuquina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β y TNF- α o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocidas entre los expertos de este campo. Otros aditivos para el crecimiento celular son entre otros el surfactante, plasmanate y agentes reductores como el N-acetil-cisteína y el 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20, Optimizador, con adición de aminoácidos, piruvato de sodio y vitaminas, bien sea libres de suero o

suplementadas con una cantidad adecuada de suero (o plasma) o una serie definida de hormonas y/o una cantidad suficiente de citoquinas para el crecimiento y expansión de las células T. Los antibióticos como la penicilina y estreptomicina, se incluyen tan solo en cultivos experimentales, mas no en cultivos de células que deben infundirse a un sujeto. Las células **blanco** se mantienen bajo condiciones necesarias para apoyar el crecimiento por ejemplo a una temperatura apropiada (37°C) y a una atmosfera correspondiente (por ejemplo, aire más 5% de CO₂).

Las células T que se hubiesen expuesto a tiempos variados de estimulación pueden exhibir diversas características. Por ejemplo, los productos típicos de sangre o de células mononucleares de sangre periférica aferesada tienen una población de células T ayudantes (T_H, CD4⁺) superior a la población de citotóxicos o de células T supresoras (T_c, CD8⁺). La expansión ex vivo de células T mediante estimulación de receptores CD3 y CD28 produce una población de células T que antes de los días 8 – 9 produce esencialmente las células T_H, mientras que en los días 8 – 9 la población de células T comprende una población mucho mayor de células T_c. En este orden de ideas, de acuerdo con el propósito del tratamiento, la infusión a un sujeto de células T que comprende en su población esencialmente células T_H, puede presentar ventajas. De manera análoga, si se aísla un subconjunto de células T_c específicas para el antígeno puede resultar beneficioso expandir este subconjunto hasta obtener un grado mayor.

07

Por otro lado, además de los marcadores CD4 y CD8, otros marcadores fenotípicos varían en forma significativa, pero en gran medida se reproducen durante el curso del proceso de expansión celular. De esta forma, dicha reproductibilidad permite diseñar un producto de celular T activada para propósitos específicos.

Aplicación Terapéutica

El presente invento se refiere a una célula (por ejemplo, célula T) transducida con un vector lentiviral (LV). Por ejemplo, el LV codifica un CAR que combina un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico con un dominio intracelular de CD3-zeta, CD28, 4-1BB o cualquiera de sus combinaciones. Por lo tanto, en ciertos casos, la célula transducida T puede mostrar una respuesta de célula T mediada por CAR.

El invento brinda el uso de un CAR para re-direccionar la especificidad de una célula T primaria para un antígeno tumoral. De esta forma, este invento proporciona también un método para estimular una respuesta inmune mediada por célula T para una población celular blanco o tejido en un mamífero que comprenda el paso de administrarle a dicho mamífero una célula T que exprese un CAR, donde el CAR comprenda un medio de unión que interactúe específicamente con un blanco predeterminado, una porción de cadena zeta que comprenda por

ejemplo el dominio intracelular de CD3 zeta humano y una región de señalización co-estimuladora.

Según una presentación, este invento incluye un tipo de terapia celular donde las células T se encuentran genéticamente modificadas para expresar un CAR y la célula T CAR se infunde a un receptor que la requiera. La célula infundida es capaz de eliminar células tumorales en el receptor. A diferencia de las terapias anticuerpo, las células CAR T son capaces de replicarse in vivo dando como resultado persistencia a largo plazo que pueda conducir al control tumoral sostenido.

En una presentación, las células CAR T del invento pueden someterse a una expansión robusta de células T in vivo y pueden persistir por un periodo prolongado de tiempo. Según otra presentación, las células CAR T del invento evolucionan hacia células específicas de memoria T que pueden reactivarse para inhibir cualquier formación o crecimiento tumoral adicional. Por ejemplo, no se esperaba que las células CART19 del invento pudieran someterse a una expansión robusta in vivo de células T y persistir a altos niveles por un periodo prolongado de tiempo en sangre y médula ósea y formar células específicas de memoria T. Sin necesidad de vincularse a una teoría en particular, las células CAR T pueden diferenciarse in vivo en un estado central similar a la memoria en el momento de encuentro y posterior a la eliminación de células objetivo que expresen el antígeno surogado.

001

Sin adherirse a una teoría en particular, la respuesta de inmunidad antitumoral mostrada por las células T modificadas por CAR pueden convertirse en una respuesta inmune activa o pasiva. Adicionalmente, la respuesta inmune mediada por CAR puede ser parte de un enfoque de inmunoterapia adoptiva en el que las células T modificadas por CAR inducen una respuesta inmune específica al medio de unión de antígeno en el CAR. Por ejemplo, las células CART19 muestran una respuesta inmune específica contra las células que expresen CD19.

Si bien los datos revelados en este trabajo muestran específicamente el vector lentiviral que comprende el anti-CD19 scFv derivado de anticuerpo monoclonal murine FMC63, dominio de vinculación humana CD8 α y transmembrana, y dominios de señalización humana 4-1BB y CD3 zeta, el invento deberá interpretarse en el sentido de incluir cualquier serie de variaciones para cada uno de los componentes del constructo tal y como se describió en otro apartado de este trabajo. Es decir, el invento incluye el uso de cualquier medio de unión al antígeno en el CAR para generar una respuesta celular T mediada por CAR específica para el medio de unión con el antígeno. Por ejemplo, el medio de unión con el antígeno en el CAR del invento puede detectar un antígeno tumoral para los propósitos de tratamiento de cáncer.

Los cánceres que pueden ser tratados incluyen tumores que no estén vascularizados, o que todavía no se encuentren sustancialmente vascularizados,

100

al igual que tumores vascularizados. Los cánceres pueden comprender tumores no sólidos (como los tumores hematológicos, por ejemplo, las leucemias y linfomas) o puede tratarse de tumores sólidos. Los tipos de cánceres que se tratarán con los CARs del invento incluyen pero sin limitarse al carcinoma, blastoma y sarcoma y ciertas malignancias de leucemia o linfoides, tumores benignos y malignos y malignancias, como sarcomas, carcinomas y melanomas. Se incluyen también tumores/cánceres de adultos y tumores/cánceres pediátricos.

Los cánceres hematológicos son aquellos que ocurren en sangre o médula ósea. Los ejemplos de cánceres hematológicos (o hematogénos) incluyen leucemias, como las leucemias agudas (tales como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda y mieloblastos, promielocíticos, mielomonocíticos, monocíticos y eritroleucemia), leucemias crónicas (como la leucemia (granulocítica) mielocítica crónica, leucemia mieloblástica crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no-Hodgkin (formas indolentes y de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de cadena pesada, síndrome de mielodisplasia, leucemia celular vellosa y mielodisplasia.

Los tumores sólidos son más anormales de tejido que usualmente no contienen quistes ni áreas liquecidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos. Los tipos diversos de tumores sólidos se nombran de acuerdo con el tipo de células que los formen (como sarcomas, carcinomas y linfomas). Entre los

101

ejemplos de tumores sólidos, como los sarcomas y carcinomas están los fibrosarcomas, mixosarcomas, liposarcoma, codrosarcoma, osteosarcoma y otros sarcomas, sinovioma y mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, malignancia linfoide, cáncer pancreático, cáncer de seno, cánceres de pulmón, ovárico, de próstata, hepatocelular, carcinoma de célula escamosa, carcinoma de célula basal, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de tiroides medular, carcinoma de tiroides papilar, carcinoma de glándula sebácea de feocromocitoma, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de célula renal, hepatoma, carcinoma del ducto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilm, cáncer cervical, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga, melanoma y tumores del sistema nervioso central (como glioma (tales como el glioma de tallo cerebral y gliomas combinados) glioblastomas (que se conocen también como glioblastomas multiformes) astrocitoma, linfoma del Sistema Nervioso Central, germinoma, meduloblastoma, craneofaringioma de Schwannoma, ependinoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, neuroblastoma, retinoblastoma y metástasis cerebral).

En una presentación, la porción del medio de antígeno del CAR del invento está diseñada para tratar un cáncer en particular. Por ejemplo, el CAR diseñado para abordar el CD19 puede también utilizarse para tratar cánceres y desórdenes que incluyen pero no se limitan al pre-B ALL (indicación pediátrica), ALL adulto, linfoma

102

celular mantle, linfoma celular difuso grande B, trasplante de medula ósea alogénica salvaje y similares.

En otra presentación, el CAR puede diseñarse para abordar el CD22 para el tratamiento de linfoma de células B difusas y grandes.

En una presentación, los cánceres y desórdenes incluyen pero sin limitarse al pre-B ALL (indicación pediátrica), ALL adulto, linfoma celular mantle, linfoma celular B grande y difuso, trasplante de medula ósea post alogénica salvaje y similares que pueden tratarse utilizando una combinación de CARs que aborden CD19, CD20, CD22 y RORI.

En una presentación, el CAR se puede diseñar para abordar mesotelina para tratamiento de mesotelioma, cáncer pancreático, cáncer de ovario y similares.

En una presentación, el CAR puede diseñarse para abordar CD33/IL3Ra para el tratamiento de leucemia mielogenosa aguda y similares.

En una presentación, el CAR puede diseñarse para abordar c-Met para el tratamiento del cáncer de seno negativo triple, cáncer de pulmón celular no pequeño y similares.

103

En una presentación, el CAR puede diseñarse para abordar PSMA para el tratamiento de cáncer prostático y similares.

En una presentación, el CAR puede diseñarse para abordar Glicolipido F77 para el tratamiento de cáncer de próstata y similares.

En una presentación, el CAR puede diseñarse para abordar el EGFRvIII para tratar el glioblastoma y similares.

En una presentación, se puede diseñar el CAR para abordar el GD-2 para tratar el neuroblastoma, melanoma y similares.

En una presentación, se puede diseñar el CAR para abordar el NY-ESO-1 TCR para tratar el mieloma, sarcoma, melanoma y similares.

En una presentación, se puede diseñar el CAR para abordar el MAGE A3 TCR para tratar el mieloma, sarcoma, melanoma y similares.

No obstante lo anterior, el invento no debe interpretarse como limitado únicamente a los objetivos de antígeno y enfermedades descritas; más bien, el invento debe interpretarse de manera que se incluya el blanco antigénico asociado con una enfermedad donde el CAR se puede utilizar para el tratamiento de la misma.

104

Las células T modificadas por el CAR del invento también pueden utilizarse como un tipo de vacuna por inmunización ex vivo y/o terapia in vivo en un mamífero. Preferiblemente este mamífero es un humano.

Con respecto de la inmunización ex vivo, por lo menos uno de los siguientes eventos ocurre in vitro antes de la administración de la célula a un mamífero: i) expansión de las células, ii) introducción d un acido nucléico que codifica un CAR para las células, y/o iii) crio preservación de células.

Los procedimientos ex vivo son bien conocidos en la técnica y se analizan de manera más completa a continuación. En forma breve, las células se aíslan de un mamífero (preferiblemente un humano) y se modifican genéticamente (es decir, se transducen o transfectan in vitro) con un vector que expresa un CAR descrito en este trabajo. La célula modificada por el CAR se puede administrar a un receptor mamífero para suministrarle un beneficio terapéutico. El receptor mamífero puede ser un humano y la célula modificada por el CAR puede ser autologa con respecto del receptor. En forma alterna, las células pueden ser alogénicas, singénicas o xenogénicas con respecto del receptor.

El procedimiento para expansión ex vivo del tallo hematopoyético y de las células progenitoras se describe en U.S. Pat. No. 5, 199,942, que se incorpora a este documento a manera de referencia, y se puede aplicar a la célula de este invento. Otros métodos adecuados se conocen en este campo de aplicación, por lo tanto

105

el presente invento no se limita a ningún método en particular de expansión ex vivo de las células. En términos breves, el cultivo ex vivo y la expansión de células T comprende: (1) recolección del tallo hematopoyético CD34+ y de las células progenitoras a partir de un mamífero tomándose del cultivo de sangre periférica o de los explantes de médula ósea; y (2) expandiendo dichas células ex vivo. Además de los factores de crecimiento celular descritos en U.S. Pat. No. 5, 199,942, existen otros factores como flt3-L, IL-1, IL-3 y c-kit ligandos, que se pueden utilizar para cultivar y expandir las células.

Además de utilizar una vacuna basada en células en términos de inmunización ex vivo, el presente invento también brinda composiciones y métodos para inmunización in vivo con el objeto de mostrar una respuesta inmune dirigida contra un antígeno en un paciente.

En términos generales, las células activadas y expandidas como se describe en este trabajo se pueden utilizar para el tratamiento y prevención de enfermedades que surjan en individuos que se encuentren inmuno-comprometidos. En particular, las células T modificadas por CAR del invento se utilizan para el tratamiento de CCL. Para ciertas presentaciones, las células del invento se utilizan en el tratamiento de pacientes que se encuentren en condiciones de riesgo para desarrollar CCL. Así las cosas, el presente invento proporciona métodos para el tratamiento o prevención de CCL e incluye la administración a un sujeto que lo

106

necesite de una cantidad terapéuticamente eficaz de las células T modificadas por CAR del invento.

Las células T modificadas por CAR del presente invento se pueden administrar bien sea solas, o en forma de composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes tales como IL-2 u otras citoquinas o poblaciones celulares. Brevemente, las composiciones farmacéuticas del presente invento pueden comprender una población de células blanco como se describe en este documento, en combinación con uno o más portadores farmacéutica o fisiológicamente aceptables, diluyentes o excipientes. Dichas composiciones pueden comprender buffers tales como solución salina buferada neutra, solución salina buferada de fosfato y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sucrosa o dextranes, manito; proteínas; polipeptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes; agentes quelantes como EDTA o glutathione; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y preservativos. Las composiciones del presente invento se formulan preferiblemente para administración por vía intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas de este invento se pueden administrar de manera apropiada para la enfermedad que deba tratarse (o prevenirse). La cantidad y frecuencia de administración se determinaran por medio de factores como la condición del paciente y el tipo y severidad de la patología del paciente,

107

aun cuando las dosificaciones apropiadas pueden ser establecidas por medio de ensayos clínicos.

Cuando se señalan las expresiones "cantidad inmunológicamente eficaz", "cantidad antitumoral eficaz", "cantidad inhibidora de tumores" o "cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones de este invento que deben administrarse se establecerán por parte del médico teniendo en cuenta diferencias individuales en términos de edad, peso corporal, tamaño del tumor, grado de infección o metástasis y condición del paciente (sujeto). Se puede establecer en términos generales que una composición farmacéutica que comprenda las células T que se describen en este documento pueden administrarse a una dosis de 10^4 hasta 10^9 células/kg peso corporal, preferiblemente 10^5 hasta 10^6 células/kg pesos corporal, incluyendo todos los valores integrales que se encuentren dentro de dichos rangos. Las composiciones de células T también se pueden administrar múltiples veces con estas dosis. Las células se pueden administrar utilizando técnicas de infusión que son muy conocidas en la inmunoterapia (ver, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988). La dosificación óptima y el régimen de tratamiento para un paciente en particular se puede establecer rápidamente por parte de un experto en la ciencia de la medicina monitoreando el paciente para detectar signos de la patología y ajustando el tratamiento según corresponda.

Para ciertas presentaciones, puede ser adecuado administrar células T activadas a un sujeto y luego sacarle posteriormente sangre (o lograr que se realice una

(100)

aféresis), activando las células T a partir de este procedimiento de acuerdo con este invento, y haciendo re infusión al paciente de estas células T activadas y expandidas. Este proceso se puede realizar múltiples veces cada ciertas semanas. Para algunas presentaciones, las células T se pueden activar a partir de tomas de sangre desde 10 cc hasta 400 cc. En algunos casos, las células T se activan a partir de tomas de sangre de 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc o 100cc. Para no apegarnos a una teoría en particular, el uso de estas múltiples re infusiones de sangre el protocolo puede servir para seleccionar ciertas poblaciones de células T.

La administración de las composiciones del sujeto pueden realizarse de cualquier manera adecuada, incluyendo la inhalación de aerosol, inyección, ingesta, transfusión, implante o trasplante. Las composiciones descritas en este trabajo se pueden administrar a un paciente por vía sub-cutánea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, por inyección intravenosa (i.v.) o intraperitoneal. En uno de los casos, la composición de células T de este trabajo se administran a un paciente por medio de inyección intradérmica o sub-cutánea. En otro caso, las composiciones de las células T de este invento se administran preferiblemente por inyección i.v. Las composiciones de la célula T se pueden inyectar directamente en un tumor, nodo linfático o sitio de infección.

En algunas presentaciones de este invento, las células activadas y expandidas que utilicen los métodos que se describen aquí, u otros métodos conocidos en

(10)

este campo en donde las células T queden expandidas a niveles terapéuticos, se les administra a un paciente conjuntamente con (por ejemplo, antes en forma simultánea o posterior) cualquier numero de modalidades relevantes de tratamiento, incluyendo pero sin limitarse al tratamiento con agentes tales como terapia antiviral, cidofovir e interluquina-2, Citarabina (que se conoce también como ARA-C) o tratamiento natalizumab para pacientes MS o tratamiento efalizumab para pacientes con soriasis u otros tratamientos para pacientes con PML. En casos posteriores, las células T de este trabajo pueden utilizarse en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoablativos como CAM PATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias de anticuerpos, citoxinas, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides FR901228, citoquinas e irradiación. Estos medicamentos inhiben el calcinerun fosfatasa dependiente del calcio (ciclosporina y FK506) o bien inhiben la quinasa p70S6 que es importante para el factor de crecimiento que induce señalización (rafamicina) (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). En una presentación adicional, las composiciones celulares de este trabajo se administran al paciente con (es decir, antes, simultáneamente, o con posterioridad) trasplante de medula ósea, terapia ablativa de células T utilizando agentes de quimioterapia tales como fludarabina, terapia de radiación con rayo externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. En otro caso, las composiciones celulares de este invento se administran después de

X
110

la terapia ablativa de células B tales como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo Rituxan. Por ejemplo, en una presentación los sujetos se pueden someter a un tratamiento estándar con altas dosis de quimioterapia seguidas por trasplante de células madre de sangre periférica. En ciertas presentaciones, después del trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmune expandidas de este trabajo. En un caso adicional, las células expandidas son administradas antes o después de la cirugía.

La dosificación de los tratamientos descritos anteriormente para administrarlos a un paciente variara con respecto de la naturaleza precisa de la condición que se trate y de los receptores del tratamiento. La escalada de dosis para administración humana se puede realizar de acuerdo con las prácticas aceptadas por este campo de investigación. La dosis para CAMPATH, por ejemplo, se ubicara en términos generales dentro del rango de 1 hasta 100 mg aproximadamente para un paciente adulto, con administración diaria por lo general durante un periodo entre 1 y 30 días. La dosis diaria preferida es de 1 a 10 mg por día aun cuando en algunos casos se pueden utilizar dosis mayores hasta de 40 mg por día (según se describe en la patente U.S. Patent No. 6, 120,766).

EJEMPLOS EXPERIMENTALES

El invento se describe adicionalmente en detalle por referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan para fines de

ilustración únicamente y no tiene por objeto ser limitantes a menos que se especifique un procedimiento distinto. De esta manera, el invento no debería en ninguna forma interpretarse como limitado a los siguientes ejemplos, sino mas bien debe interpretarse como el encierro de todas y cada una de las variaciones que se hacen evidentes como resultado de la demostración que se explicita en este trabajo.

Sin una descripción adicional, se considera que una persona con conocimientos en la materia puede mediante el uso de la descripción que precede y manejando los siguientes ejemplos ilustrativos, realizar y utilizar los compuestos de este invento y practicar los métodos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo por consiguiente señalan específicamente las presentaciones preferidas de este invento y no deben interpretarse como una limitación en forma alguna de la parte restante de la revelación.

Ejemplo 1: Célula T que expresan receptores quiméricos, establecen memoria y efectos antitumorales potentes en pacientes con leucemia avanzada.

Los linfocitos modificados para expresar receptores de antígenos quiméricos (CARs) han demostrado mínima expansión in vivo y efectos antitumorales en ensayos clínicos previos. Los resultados que se presentan en este trabajo demuestran que las células CAR T que contienen CD137 desempeñan una actividad clínica resistente y potente sin transversalidad a partir de la infusión en

112

tres de los tres pacientes tratados con Leucemia Linfocítica Crónica Avanzada (CLL). Las células T modificadas se expandieron más de 1000 veces in vivo, migraron hacia la médula ósea y continuaron expresando CARs funcionales a niveles elevados durante 6 meses como mínimo. En promedio, cada célula infundida CAR+ T erradica como mínimo 1000 células CLL. Se demostró una respuesta inmune específica A CD19 en sangre y médula ósea, acompañada de remisión completa en dos de los tres pacientes. Una porción de las células persiste como célula de memoria CAR+ T, indicando el potencial de este enfoque restringido no-MHC para el tratamiento eficaz de condiciones malignas de células B.

Los materiales y métodos utilizados en estos experimentos se describen a continuación.

Materiales y Métodos

Declaración General de Laboratorio

El procesamiento, congelación y análisis de laboratorio para las muestras de investigación se realizaron en el Laboratorio de Estudios Translacionales y Correlativos de la Universidad de Pensilvania que opera bajo los principios de Buenas Prácticas de Laboratorio con los SOP establecidos y/o protocolos para recibo, procesamiento, congelado y análisis de muestras. El desempeño de los

113

ensayos y reporte de datos están de acuerdo con las guías MIATA (Janetzki et al., 2009, Immunity 31:527-528).

Diseño de Protocolo

El ensayo clínico (NCT01029366) se llevo a cabo como se diagrama en la Figura

1. Los pacientes con condición maligna hematológica positiva CD19 con enfermedad persistente luego de por lo menos dos regímenes previos de tratamiento y que no fueron elegibles para trasplante de célula madre alogénica fueron elegibles para el estudio. Luego de la reubicación de tumor, las células T de sangre periférica para elaboración de CAR19 se recolectaron mediante aféresis y a los sujetos se les aplicó una serie sencilla de quimioterapia como se especifica en la Figura 10 durante la semana anterior a la infusión. Se administraron las células CAR19 mediante infusión intravenosa utilizando un régimen de dosis dividida de 3 días (10%, 30% y 60%) en la dosis que se indica en la Figura 10 y dentro de las disponibilidades, se administró una segunda dosis el día 10. Solamente el paciente UPN 02 poseía células suficientes para una segunda infusión. Los sujetos fueron evaluados en cuanto a toxicidad y respuesta a intervalos frecuentes durante 6 meses como mínimo. El protocolo fue aprobado por la Agencia de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos, por el Comité Asesor Recombinante ADN y por la Junta Institucional de Revisión de la Universidad de Pensilvania. El primer día de infusión se estableció como día de estudio 0.

119

Sujetos: Resumen Clínico

Los resúmenes clínicos se especifican en la Figura 10 y se suministran historias clínicas detalladas en otro aparte de este documento. El paciente UPN 01 fue diagnosticado por primera vez con célula etapa IIB CLL a la edad de 55 años. El paciente se considero asintomático y luego se observo durante 1-1/2 años aproximadamente hasta cuando requirió terapia para linfocitosis progresiva, trombocitopenia, adenopatía y esplenomegalia. Durante el periodo de tiempo del estudio, el paciente recibió líneas previas de terapia. La terapia mas reciente correspondió a 2 ciclos de pentostatin, ciclofosfamida y rituximab 2 meses antes de la infusión celular CART19 con respuesta mínima. El paciente luego recibió un ciclo de bendamustina como quimioterapia linfagotante con anterioridad a la infusión celular CART-19.

El paciente UPN 02 fue diagnosticado en primer término con CLL a la edad de 68 años cuando se presento con eventos de fatiga y leucocitosis. El paciente se mostro relativamente estable durante 4 años y luego desarrollo leucocitosis progresiva (195,000/ μ l) anemia y trombositopenia que requirieron de terapia. El análisis cariotipico demostró que las células CLL habían hecho eliminación del cromosoma 17p. En razón de la enfermedad progresiva, el paciente fue tratado con alemtuzumab con respuesta parcial pero dentro del término de uno y medio años el paciente presento una enfermedad progresiva. El paciente fue tratado

115

nuevamente con alemtuzumab durante 18 semanas con respuesta parcial y un año de avance de intervalo libre. El paciente recibió luego dos ciclos de bendamustina con rituximab sin observarse ninguna respuesta significativa (Figura 5^a). El paciente recibió luego un solo agente bendamustina como quimioterapia linfagotadora con anterioridad a la infusión celular CAR19.

El paciente UPN 03 se presentó a la edad de 50 años con una etapa asintomática 1CLL y se le hizo seguimiento durante varios años. El paciente presentó leucocitosis progresiva (conteo de glóbulos blancos de 92,000/ μ l) y adenopatía progresiva que requirió de terapia. El paciente recibió dos ciclos de rituximab con fludarabina que dio como resultado la normalización de conteos sanguíneos y mejoras significativas aun cuando no hubo una resolución completa en cuanto a la adenopatía. El paciente tuvo un intervalo libre de progreso de aproximadamente tres años. Las pruebas cariotípicas mostraron que las células contenían eliminación del cromosoma 17p con FISH que demostró una eliminación TP53 en 170 de 200 células. En los siguientes años el paciente requirió 3 líneas diversas de terapia (Figura 10) para leucocitosis progresiva y adenopatía, recibiendo por último alemtuzumab con respuesta parcial 6 meses antes de la infusión celular CART-19. El paciente recibió pentostatin y cicofosfamida como quimioterapia linfagotante con anterioridad a la infusión celular CAR19.

Producción de Vectores

116

El transgen CD19-BB-z (GeMCRIS 0607-793) fue diseñado y construido según descripción (Milone et al., 2009, Mol Ther. 17:1453-1464). El Vector Lentiviral se produjo de acuerdo con las buenas prácticas de manufactura vigentes, utilizando un enfoque de producción triplasmido en Lentigen Corporation según descripción (Zufferey et al., 1997, Nature biotechnol 15:87-875).

Preparacion del producto celular CART19

Los métodos de preparación T utilizando esferas de polistireno paramagnético recubiertas con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 se describieron en este estudio (Laport et al., 2003, Blood 102: 2004-2013) se realizó la transducción lentiviral de acuerdo con la descripción (Levine et al., 2006, Proc Natl Acad Sci U.S.A. 103:17372-17377).

Métodos para cálculo de carga tumoral

La carga CLL en línea basal se calculo como se aprecia en la Figura 10. La cantidad de células CLL se calculó en medula ósea, sangre y tejidos linfoides secundarios de acuerdo con la descripción que se presenta más adelante.

Médula ósea: en adultos saludables la medula ósea representa aproximadamente el 5% del peso total corporal (Woodard et al., 1960, Phys Med Biol, 5:57-59; Bigler et al., 1976, Health Phys 31:213-218). La medula ósea en muestras de cresta

117

iliaca tiene un porcentaje cada vez mayor de medula inactiva (grasosa) con respecto de la edad, elevándose a partir del 20% de la medula total a la edad de 5 años hasta el 50% aproximadamente a la edad de 35, época en la cual permanece estable hasta la edad de 65 años y luego se eleva al 67% aproximadamente de medula inactiva en la edad de 75 años (Harstocket al., 1965, Am J Clin Path 43:326-331). El valor internacional de referencia para el peso esquelético total de medula activa (roja) e inactiva (grasosa) para hombres a la edad de 35 es de 1170g actualmente y de 2480g respectivamente (datos anatómicos y fisiológicos básicos que se utilizan en protección radiológica): esqueleto de animales de ICRP, Vol. 25(ed. Smith, H) 58 – 68 (Reporte de Grupo de Tareas del Comité 2 de la Comisión Internacional sobre la Protección Radiológica, Oxford, 1995)). Los hombres adultos entre las edades de 35 a 65 años tienen medulas que representan el 5.0% del peso total corporal, que se conforma con 1.6% como medula activa (roja) y 3.4% como medula inactiva (grasosa) (datos anatómicos y fisiológicos básicos utilizados en protección radiológica: esqueleto de animales del ICRP, Vol. 25 (ed. Smith, H.) 58-68 (Informe de Grupo de Tareas del Comité 2 de la Comisión Internacional sobre Protección Radiología, Oxford, 1995)). De acuerdo con la biopsia de medula ósea y las muestras de aspirado, el peso de la célula CLL para los tres pacientes en la línea basal se calculo como se puede apreciar en la Tabla 1. Estos estimados en total de la masa ósea CLL se transformaron luego en el número celular total CLL en la medula utilizando $1\text{kg} = 10^{12}$ células, y los números resultantes se pueden apreciar en la Figura 10. Estos cálculos se basan en el supuesto que el CLL tiene una distribución uniforme en la

1190

medula ósea. Para el paciente UPN 01, los cálculos demuestran para el caso de una biopsia de medula que se obtuvo antes de la quimioterapia con bendamustina, y para un aspirado obtenido después de la bendamustina y la infusión previa a CART19. Los valores son menos precisos para el aspirado del día 1 en comparación con la muestra de biopsia del día 14 debido a limitaciones técnicas del aspirado del día 1. El paciente UPN 02 tuvo una sola muestra de biopsia pre-tratamiento que mostro reposición completa de medula por CLL. Este paciente presento una muestra sin cambios el día 30 post CART19. La carga de medula para el paciente UPN 03 se calculó de acuerdo con una post quimioterapia y una biopsia pre CART19.

Tabla 1: Masa de Médula

	Peso de medula activa (kg)	Peso de medula inactiva (kg)	Medula total (kg)
Hombres normales (norma de referencia ICRP)	1.17	2.48	3.65
UPN 01 día 14 (95% celular)	3.47	0.18	3.65
UPN 02 día 47 (95% celular)	3.47	0.18	3.65

1109

UPN 03 día 1 (60% celular)	2.19	1.46	3.65
Peso de CLL (KG)			
UPN 01 día 14 (70% CLL)			
UPN 01 día 1 (50% CLL por coagulo)	2.43 1.73		
UPN 02 día 47 (>95% CLL)	3.29		
UPN 03 día 1 (40% CLL)	0.88		

Sangre: solamente el paciente UPN 02 presento carga tumoral sustancial CLL en la infusión sanguínea pre-CART19. La citometria de flujo demostró que las células tenían un fenotipo típico como población clonal con una superficie leve restringida por capa CD5+CD10-CD19 CD20 (dim)+ CD3 (variable)+ IgM-B de población celular. Aproximadamente el 35% de las células CLL co-expresaron CD38. La carga CLL no se aclaro con tres ciclos de quimioterapia con bendamustina y estuvo presente en el momento de la infusión de CART19. En el momento de la infusión CART19, el conteo CLL en sangre fue de 55,000 células/µl. Asumiendo un volumen sanguíneo de 5.01l, el paciente UPN 02 tuvo 2.75×10^{11} células CLL

120

en sangre el día cero. Dado el valor WBC normal en términos generales en los pacientes 01 y 03, la carga circulante de enfermedad en estos pacientes no se pudo calcular, lo cual podría conducir a un sub-estimado ligero de carga total corporal.

Tejidos linfoides secundarios: el volumen de linfadenopatía y esplenomegalia se cuantificó en los scan axial CT utilizando un software aprobado por la FDA. Los volúmenes se aplican a tórax, abdomen y pelvis solamente. Las masas provenientes del cuerpo vertebral T 1 hasta el nivel de bifurcación de la arteria femoral común se midieron para todos los pacientes, y en algunos de ellos, los nodos en el área inguinal también se incluyeron. Los nodos en cabeza/cuello y extremidades se excluyeron del análisis e igualmente se retiraron del número de células blanco CLL de línea basal, lo cual podría también conducir a un sub-estimado ligero de la carga total del cuerpo. Los pacientes UPN 01 y 03 han tenido remisiones sostenidas completas superiores a 6 meses y de esta manera la fórmula (volumen de línea basal – volumen a 3 meses) se utilizó para determinar la reducción en la carga tumoral a partir de la línea basal. El paciente UPN 02 presentó una enfermedad estable en cuanto a la adenopatía y en estas condiciones la masa tumoral de línea basal se calculó restando el volumen esplénico de referencia de la edad que se comparó con hombres saludables (Harris et al., 2010, Eur J Radiol 75:e97-e101). La masa tumoral de línea basal se convirtió en células CLL utilizando un enfoque de densidad (densidad 1 kg/l, y 1 kg = 10¹² células) para las células o bien un enfoque de volumen (CLL que tienen

21

un diámetro de 10µm o 600fl, asumiendo una forma esférica) y ambos valores de presentan en la Figura 10. Los volúmenes tumorales en tejidos linfoides secundarios de los tres pacientes se pueden apreciar más adelante en la Tabla 2 de acuerdo con los cálculos a partir de los scan CT disponibles.

Tabla 2: Volúmenes de Tumor

Paciente	Día de estudio	Volumen LN (mm3)	Volumen de Vejiga (mm3)	Volumen Total (mm3)
UPN 01	-37	239655	1619180	1858835
	1 MES	105005	1258575	1363580
	3 MESES	65060	1176625	1241685
UPN 02	-24	115990	1166800	1282790
	1 MES	111755	940960	1052715
UPN 03	-10	239160	435825	674985
	1 MES	111525	371200	482725
	3 MESES	47245	299860	347105

El scan CT de línea basal para el paciente UPN 01 se realizó 8 días después de 2 ciclos de pentostatin/ ciclofosfamide/ rituximab y no se mostro ninguna respuesta ante este régimen de quimioterapia en comparación con el scan previo CT. El paciente tuvo un ciclo de bendamustine antes del CART 19 y en estas

122

condiciones, el cambio en cuanto a volumen tumoral a partir del día 37 hasta el día +31 para UPN 01 no puede excluir el aporte potencial del bendamustine al igual que del CAR 19. De manera análoga, el cambio en volumen tumoral para UPN 03 refleja el efecto combinado de un ciclo de pentastatin/ciclofosfamida y CART 19.

Método para calcular la eficacia in vivo de la proporción E:T en pacientes

La proporción E:T de células CAR T infundidas con respecto del número de células tumorales eliminadas se calculó utilizando el número de células tumorales presentes en el momento de la inyección celular CAR T con el número de células inyectadas CAR T (Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106:3360-3365). Para el presente invento, el número de células inyectadas CART19+ T como se observa en la Figura 10 se utilizó por cuanto no es posible determinar el número absoluto de células CART19+ T presentes in vivo con suficiente exactitud o precisión. Los datos disponibles sobre expansión CART19 en sangre y medula son robustos como se muestra en las Figuras 2 y 6. Sin embargo no fue posible determinar la migración de CART19 hacia otros sitios tales como tejidos linfoides secundarios, creando así incertidumbre sustancial sobre el número total de células CART19 logradas in vivo en el momento de la reducción máxima de tumor. Los valores calculados a partir de la Tabla 3 se utilizaron para derivar las proporciones eficaces E: T.

Tabla 3: Proporciones calculadas CART19 E:T logradas in vivo

723

Paciente	Carga tumoral (línea basal y delta)				Células CART19+ infundionadas	In vivo E:T
	Línea basal de Medula ósea	Línea basal de Sangre	Línea basal de Nodos/ Bazo	Cambio total en carga CLL		
UPN 01	1.70E+12	N/A	8.1E+11	2.51E+12	1.13E+09	1:2200
UPN 02	3.20E+12	2.75E+11	1.6E+12	2.74E+11 ²	5.80E+08	1:1000
UPN 03	8.80E+11	N/A	4.4E+11	1.32E+12	1.42E+07	193,000

Rango 1000 – 93.000

1= Promedio de densidad y volumen

2= El paciente UPN 02 no respondió en relación con la medula ósea y presentó una reducción parcial en adenopatía (células 3.1E+11) en las masas tumorales medidas por CT en bazo y nodos linfáticos. Ver Figura 5A donde se encuentra la respuesta en sangre.

Procesamiento y congelación de muestra:

Se coleccionaron las muestras (sangre periférica, medula) en tubos vacutainer color lavander en parte superior (K2EDTA) o rojos en la parte superior (sin

124

aditivos) (Becton Dickinson) y se aplicaron al TCSL dentro de las 2 horas siguientes a la toma. Las muestras fueron procesadas dentro de los 30 minutos siguientes al recibo de acuerdo con el SOP establecido del laboratorio. La sangre periférica y las células mononucleares de medula se purificaron vía centrifugación de gradiente de densidad Ficoll utilizando Ficoll-Paque (GE Health care, 17+1440-03) y se congelaron en RPMI (Gibco 11875-135) suplementándose con albumina de suero humano al 4% (Gemini Bio-Products, 800-120), Hetastarch al 2% (Novaplus, NDC0409-7248-49) Y DMSO al 10% (Sigma, D2650) utilizando contenedores de congelación 5100 Cryo 1°; después de 24 – 72 horas a -80°C, las células fueron transferidas a Nitrógeno líquido para almacenamiento a largo plazo. Las muestras de aféresis fueron obtenidas a través del hospital de la Universidad de Pensilvania, Banco de Sangre y se procesaron en el CVPF mediante purificación de gradiente Ficoll y se congelaron como se describió anteriormente. La viabilidad inmediatamente después de la congelación fue superior al 85% en el momento en que se hizo la evaluación. Para el aislamiento de suero, se permitió que las muestras se coagularan durante 1.5 – horas a temperatura ambiente; y el suero se aisló mediante centrifugación, y las alícuotas para un solo uso de 100 µl se congelaron a -80°C.

Líneas Celulares

El K562 (CML, CD19- negativo) se obtuvo de ATCC (CCL-243). El K562/CD19, que fue un obsequio generoso de Carmine Carpenito, es un elemento K562

transducido lentiviralmente a una frecuencia al 100% para expresar la molécula CD19. El NALM-6, que es un CD19- positivo distinto de T, la línea celular precursora B distinta de B ALL (Hurwita, et al., 1979, Int J Cancer 23:174-180) y confirmada para expresar el antígeno CD19 fue un obsequio generoso de Laurence Cooper. Las líneas celulares antes descritas se mantuvieron en un medio R10 (RPMI 1640) (Gibco, 11875) suplementado con suero bovino fetal al 10% (Hyclone) y Pen-Strep al 1% (Gibco, 15140 - 122). Las células mononucleares periféricas (ND365) provenientes de un donante saludable se obtuvieron mediante aféresis a partir del Core de Inmunología Humana de la Universidad de Pensilvania y luego se procesaron y congelaron como se describió anteriormente.

Aislamiento del ADN y análisis Q-PCR

Se recolectaron muestras de sangre entera o medula en tubos color lavanda (K3EDTA) BD del tipo vacutainer (Becton Dickinson). El ADN Genómico se aisló directamente a partir de la sangre entera utilizando midi kits (Qiagen) de sangre ADN Q1Aamp y el SOP de laboratorio establecido y luego se cuantificaron mediante espectro fotómetro, y se almacenaron a una temperatura de -80°C. Se realizó el análisis Q-PCR en las muestras ADN genómicas en bruto utilizando ADN genómico de 123 – 200ng/ punto en el tiempo, tecnología ABI Taqman y un ensayo validado para detectar la secuencia de transgene integrada CD19 CAR. Los rangos paramétricos de aprueba/desaprueba incluyendo la inclinación de

176

curva estándar y los valores r^2 , la capacidad de cuantificar en forma exacta una muestra de referencia (1000 copias/spike plasmid) y sin amplificación en la muestra ADN de donante saludable se calcularon a partir de los estudios de cualificación y según rangos de aceptación pre-establecidos. El primer/sondas para el transgene CD19 CAR correspondieron a lo descrito (Milone et al., 2009, Mol Ther 17:1453-1464). Para determinar el numero/ ADN unitario de copia se genero una curva estándar de 8 puntos consistente en $10^6 - 5$ copias de plásmido lentivirus colocados dentro del ADN genómico de control no transducido de 100ng. Cada punto de datos (muestras, curva estándar, muestras de referencia) se evaluó en triplicado con reporte de valores promedio. Para el paciente UPN 01, todos los valores reportados se derivaron a partir de un valor positivo Ct en replicas 3/3 con %CV inferior a 0.46%. Para el paciente UPN 02, con excepción de la muestra del día +177 (2/3 de replicados positivos, alto %CV), todos los valores reportados se derivaron a partir de un valor positivo Ct en 3/3 replicas con %CV inferior a 0.72%. Para el paciente UPN 03, con excepción de la muestra del día +1 (2/3 de replicas positivas, 0.8% CV) y la muestra del día +3 (2/3 replicados positivos, 0.67% CV), todos los valores reportados se derivaron a partir de un valor positivo CT en 3/3 replicas con %CV inferior a 1.56%. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) para el ensayo se determino a partir de la curva estándar en dos copias /microgramo ADN (10 copias/200 ng input ADN); con valores promedio por debajo de LLOQ (es decir, reportables y no cuantificables) que se consideraron como aproximados. Se realizo una reacción de amplificación en paralelo para controlar la calidad de ADN cuestionado utilizando ADN genómico

12X

de input de 12 – 20 ng, una combinación primer/sonda específica para la secuencia genómica no transcrita del gen CDKN1A (GENEBANK: Z85996) (primer de detección: GAAAGCTGACTGCCCCCTATTTG; SEQ ID No: 25, primer anti – sentido, GAGAGGAAGTGCTGGGAACAAT; SEQ ID NO. 26, sonda: VIC- CTC CCC AGT CTC TTTT; SEQ ID No. 27) y curva estándar de 8 puntos creada por dilución de ADN genómico de control; estas reacciones de amplificación produjeron un factor de corrección (CF) (ng detectado/ng input). Los transgenes de copias/ADN de microgramos se calcularon de acuerdo con la fórmula: copias calculadas a partir de la curva estándar CD19/ ADN input (ng) x CF x 1000 ng. La precisión de este ensayo se determinó mediante la capacidad de cuantificar marcaciones del producto de célula infundida por medio de Q-PCR de acuerdo con la siguiente fórmula: marcación promedio = copias detectadas/ADN input x 6.3 pg ADN/célula somática macho x CF versus positividad de transgene mediante citometría de flujo utilizando reactivos de detección específicos para CAR. Estas determinaciones en ciego generaron marcaciones de 22.68% para el producto de infusión UPN 01 (22.6% por citometría de flujo), 32.33% de marcación para producto de infusión UPN 02 (23% por citometría de flujo) y 4.3% de marcación para el producto de infusión UPN 03 (4.7% de marcación por citometría de flujo).

Análisis de Citoquina

La cuantificación de factores solubles de citoquina se realizó utilizando la tecnología de elementos esféricos Luminex y kits comprados en tecnologías Life

120

(Invitrogen). Se realizaron los ensayos de acuerdo con el protocolo del fabricante utilizando una curva estándar de 8 puntos generada utilizando una serie de disolución de 3 veces. Cada punto estándar y muestra se evaluaron en duplicado en una dilución 1:3, se calculo el porcentaje CV para las mediciones en duplicado que fueron inferiores a un 15%. Se adquirieron los datos en un Bioplex 200 y se analizaron con el software versión 5.0 de Bioplex Manager utilizando análisis de regresión de logística de 5 parámetros. Los rangos de cuantificación de curva estándar se determinaron mediante el rango 80 – 120% (valor observado/esperado). Los rangos de cuantificación de analitos individuales se reportan en los textos de la Figura.

Ensayo celular para detectar la Función CAR

Las células fueron evaluadas con respecto de la funcionalidad después de la descongelación y del reposo durante toda la noche en TCM midiendo la desgranulación CD107 como respuesta a las células blanco. Los ensayos de desgranulación se realizaron utilizando células blanco 1×10^6 PBMC y 0.25×10^6 en un volumen final de 500 μ l en placas de 48 orificios durante 2 horas a 37°C en presencia de CD49d (Becton Dickinson), anti-CD28, monensin (e-Bioscience) y anticuerpo CD107a-FITC (eBiosciences) esencialmente como se describió anteriormente (Betts et al., 2003, J Immunol Methods 281:6578).

Reactivos de Anticuerpos

79

Se utilizaron los siguientes anticuerpos para estos estudios: MDA-CAR, anticuerpo de murine anti CD19 CAR conjugado con Alexa 647 donados por los doctores Bipulendu Jena y Laurence Cooper (MD Anderson Cancer Center). Para las inmunofenotipadas multiparametricas y ensayos funcionales: anti-CD3-A700, anti-CD8-PE-Cy7, anti-PD-1FITC anti-CD25-AF488, anti-CD28-PercP-C y 505, anti CD57-eF450, anti CD27-APC-eF780, anti -CD17-APC-eF780, anti-CD45RA-Ef605NC, CD107a-FITC (todos de e-Bioscience), anti-CD4-PE-Texas Red and Agua viva/muerta (de Life Technologies) y anti-CD14-V500, anti-CD16-V500 (de Becton Dickinson). Para inmunofenotipo general: CD3-PE, CD14-APC, CD14-PE-Cy7, CD16-FITC, CD16PE-Cy7, CD19-PE-Cy7, CD20-PE todos de Becton Dickson.

Citometria de flujo Multiparametrica

Las células fueron evaluadas mediante citometria de flujo bien sea frescas después del procesamiento Ficoll-Paque o si estuvieran congeladas después del reposo durante toda la noche a una densidad de 2×10^6 células/ml en un medio de células T (TCM) (X- vivo 15 (Lonza, 04-418Q) suplementándose con suero humano AB al 5%, (GemCall, 100 – 512), 1% Hepes (Gibco, 15630-080), 1% Pen – Strep (Gibco, 15140-122), 1% Glutamax (Gibco, 35050-061) y 0.2% N-Acetil Cisteina (American Regent, NDC0517-7610-03). El inmunofenotipo multiparametrico se realizo en 4×10^6 total de células/condición, utilizando

130

tinciones FMO como se describió en el texto. Las células fueron tincionadas a una densidad de 1×10^6 células/100µl PBS durante 30 minutos en hielo utilizando anticuerpo y concentraciones de reactivos recomendados por el fabricante, luego se lavaron re suspendieron en paraformaldehído al 0.5% y se adquirieron utilizando un LSRII modificado (BD sistemas de inmunocitometria) equipados con láser Azul (488 nm), Violeta (405 nm), Verde (532) y Rojo (633 nm) y una serie apropiada de filtros para la detección y separación de las combinaciones de anticuerpos antes descritas. Se adquirió un mínimo de 100.000 CD3+ células para cada tinción. Para los ensayos funcionales, las células fueron lavadas, tincionadas para marcadores de superficie, resuspendidas en parafolmaldehído al 0.5% y adquiridas según se describió anteriormente; luego se recolecto un mínimo de 50.000 eventos CD3+ para cada una de las condiciones de tinción. Se establecieron luego los valores de compensación utilizando tinciones sencillas de anticuerpo y esferas de compensación BD (Becton Dickinson) que se calcularon y aplicaron automáticamente por medio del instrumento. Los datos fueron analizados utilizando software de flujo Jo (Versión 8.84, Treestar). Para el inmunofenotipero general se adquirieron células utilizando un citometro Accuri C6 provisto de un laser azul (488) y rojo (633 nm). Se establecieron los valores de compensación utilizando tinciones sencillas de anticuerpo y esferas de compensación BD (Becton Dickinson) y luego se hicieron los cálculos manualmente. Los datos fueron luego analizados utilizando el paquete de análisis de software de flujo C (versión 1.0.264.9, citometros Accuri).

131

Historias medicas de los Pacientes y respuesta a las Terapia

Los resúmenes de tratamientos clínicos se describen en la Figura 10. El Paciente UPN 01 se diagnostico en primer término con células etapa II B CLL a la edad de 55 años. El paciente fue asintomático y se observo durante 1-1/2 años aproximadamente hasta cuando requirió terapia para linfocitosis progresiva, trombocitopenia, adenopatía y esplenomegalia. Después de 4 ciclos de fludarabina el paciente tenía una normalización total de conteos sanguíneos y una respuesta completa por medio de los scan CT. Se registro avance dentro de los 5 meses siguientes con linfocitosis asintomática, trombocitopenia y adenopatía en aumento. El paciente fue observado sin síntomas durante 3 años aproximadamente, y después requirió de tratamiento con Rituximab y fludarabina para la leucocitosis progresiva, anemia y trombocitopenia. El paciente fue tratado con 4 ciclos de Rituximab con fludarabina registrando una mejora parcial en los conteos sanguíneos. El paciente nuevamente registro un progreso dentro del año siguiente requiriendo terapia manifestada por leucocitosis (WBC 150.000 - μ L) y trombocitopenia (plaquetas 30.000 μ L) y se trato con aletuzumab con normalización de los conteos sanguíneos. Se registro avance dentro de los 13 meses siguientes. El paciente luego recibió Rituximab de agente sencillo sin respuesta significativa y seguida de Rituximab, ciclofosfamida, vincristina y prednisona (R-CVP) durante 2 ciclos con respuesta mínima y seguida por lenalidomida, la lenalidomida se suspendió en razón de la toxicidad. El paciente recibió 2 ciclos de pentostatina, ciclofosfamida y Rituximab con respuesta mínima.

135

Posteriormente, el paciente recibió bendamustina como quimioterapia de linfodeagotamiento 4 días antes de la infusión celular CAR19. Con anterioridad a la terapia, el WBC fue de 14.200/ μ l, hemoglobina 11.4 g/dl, conteo plaquetario 78.000/ μ l y ALC 8000/ μ l. El scan CT mostro adenopatía difusa y la medula ósea fue infiltrada extensivamente con CLL (67% de las células). El paciente recibió 1.6×10^7 CART-19 CELL/kg (1.13×10^9 total células CART 19 se evaluaron mediante FACS). No se registraron toxicidades infusionales. El paciente se hizo neutropenico aproximadamente a los 10 después de administración de bendamustina y 6 días después de las infusiones celulares con CART19 y a partir de 10 días después de la infusión con CART19, el paciente desarrollo fiebres, temblores e hipotensión transitoria. Al mismo tiempo, una placa de rayos X de tórax y scan CT demostraron que existía una neumonía del lóbulo superior izquierdo que se trató con antibióticos. Las fiebres persistieron durante 2 semanas aproximadamente y se resolvieron cuando se presento la recuperación de neutrofilos. El paciente no ha tenido ninguna otra infección posterior ni síntomas constitucionales.

El paciente logro una respuesta rápida y completa como se muestra en la Figura 5. Entre 1 y 6 meses después de la infusión no se han detectado células no circulantes CLL en la sangre según citometria de flujo. La medula ósea al cabo de 1, 3, y 6 meses después de las infusiones celulares CART19 muestra una ausencia sostenida del infiltrado linfocitico por morfología y pruebas de citometria

de flujo. Los scan CT al cabo de 1 y 3 meses después de la infusión muestran una resolución completa de adenopatía anormal. El paciente ha tenido una leucopenia persistente (WBC 1000-3900 μ l) y trombositopenia (plaquetas – 100,000 μ l) y una hipogama globulina leve (IgG 525 mg/dL, normal 650 – 2000 mg/dl, pero sin complicaciones infecciosas.

El paciente UPN 02 fue tratado con células CART19 a la edad de 77 años. El paciente presento una historia relevante de enfermedad de arteria coronaria y fue diagnosticado en primer término con CLL en 2000 a la edad 68 años cuando el paciente presento fátiga y leucocitosis. El paciente se mostro relativamente estable durante 4 años época en la cual desarrollo leucocitosis progresiva (195.000/ μ l), anemia y trombocitopenia que requirieron terapia. Las pruebas genéticas en ese momento demostraron que las células CLL tenían una eliminación del cromosoma 17p. En razón de la enfermedad progresiva, el paciente fue tratado con un curso de 12 semanas de alentuzumab con respuesta parcial y mejora en los conteos sanguíneos. Dentro del término de 1 y ½ años siguientes el paciente presento leucocitosis progresiva, anemia, trombocitopenia y esplenomegalia. El análisis cariotipico confirmo la eliminación del cromosoma 17p ahora con una eliminación del cromosoma 13q. El paciente fue nuevamente tratado con alentuzumab durante 18 semanas con mejora de leucocitos y estabilización de anemia y esplenomegalia. El paciente presento evidencia de leucocitosis progresiva, anemia y trombositopenia dentro del año siguiente. El tratamiento incluyo dos ciclos de bentamustina con rituximab dando como

139

resultado estabilidad en la enfermedad pero no se registro ninguna mejora significativa como puede apreciarse en la Figura 5A.

El paciente recibió bentamustina sola como linfagotador en quimioterapia con anterioridad a la infusión celular CART19. El paciente recibió 4.3×10^6 células CART19/kg (4.1×10^8 total de células) en 3 infusiones divididas complicadas por fiebres transitorias hasta de 102° durante 24 horas. En el día 11 después de la primera infusión, el paciente recibió una elevación de 4.1×10^8 (4.3×10^6 / kg) células CART19 y esta infusión se complico por fiebres, temblores y dificultad respiratoria sin hipoxia que requirió de una hospitalización de 24 horas. No hubo evidencia de isquemia cardíaca, y se resolvieron los síntomas. El día 15 después de la primera infusión CART19 y el día 4 después de la elevación de la infusión celular CART19 el paciente fue admitido en el hospital con fiebres altas (hasta 104°F), escalofríos y temblores. Las pruebas extensivas con cultivos de sangre y orina y el CXR no pudieron identificar una fuente de infección. El paciente se quejó de dificultades respiratorias pero no tenía hipoxia. El eco cardiograma mostro hipoquinesis severa. La fracción de eyección fue del 20%. El paciente recibió prednisona 1mg por kilogramo durante un día y 0.3 mg por kilogramo durante una semana aproximadamente. Lo anterior dio como resultado una rápida resolución de fiebres y disfunción cardíaca.

En concordancia con la aparición de altos niveles de fiebre, el paciente tuvo una caída rápida en los linfocitos a partir de la sangre periférica como se puede

25

apreciar en la Figura 5 A. Aún cuando el paciente tuvo normalización del conteo de glóbulos blancos, sí presentó CLL circulante persistente, anemia moderada estable y trombosiopenia. La medula ósea mostro infiltración persistente extensa de CLL un mes después de la terapia a pesar de la cito-reducción dramática de sangre periférica, y los scan CT mostraron una reducción parcial de adenopatía y esplenomegalia. Cinco meses después de infusiones celulares CART19, el paciente desarrollo linfocitosis progresiva. Nueve meses después de las infusiones el paciente tenía linfocitosis (16.500/ μ l) con anemia estable y modesta y trombocitopenia con adenopatía estable. El paciente continua asintomático y no ha tenido más terapias.

El paciente UPN 03 fue diagnosticado con CLL etapa 1 asintomática a la edad de 50 años y se le hizo seguimiento con observación de 6 años. Posteriormente, el paciente presento leucocitosis progresiva (conteo de glóbulos blancos 92.000/ μ l) y adenopatía progresiva que requirió terapia. EL paciente recibió 2 ciclos de rituximab con fludarabina que dio como resultado la normalización de conteos sanguíneos y mejoras significativas aun cuando no se presento la resolución total en la adenopatía. El paciente obtuvo un intervalo libre de progresión de 3 años aproximadamente seguido de los siguientes 6 meses por leucocitosis progresiva rápida (WBC 165.000/ μ l) y adenopatía progresiva que requirió de terapia. El paciente recibió un ciclo de fluradabina y 3 ciclos de rituxilab con fludarabina registrando normalización de los conteos sanguíneos y resolución de la adenopatía palpable. El paciente tuvo un intervalo libre de progresión de

38

aproximadamente 20 meses hasta cuando el paciente nuevamente desarrollo leucocitosis de progresión rápida y adenopatía. En este momento, la medula ósea se infiltro de manera extensa con CLL y el análisis de cardiotipos mostro que las células contenían eliminación del cromosoma 17p con el FISH que demostró una eliminación TP53 en la celula 170/200. EL paciente recibió un ciclo de rituximab con bendabustina seguido de 4 ciclos de bendabustina solamente (debido a una severa reacción alérgica al rituximab). El paciente presentó normalización inicial de los conteos sanguíneos pero poco tiempo después de discontinuar la terapia presento leucocitosis progresiva y adenopatía.

Las células autologas T fueron recolectadas mediante aféresis y criopreservadas a partir del paciente UPN 03. El paciente fue luego tratado con alentuzumab durante 11 semanas seguidas con una excelente respuesta hematológica. Se observo una mejora aun cuando no una resolución total en la adenopatía. El paciente tuvo una enfermedad activa pero estable durante los siguientes 6 meses. Posteriormente, el paciente recibió pentostatin y ciclofosfamida como quimioterapia linfagotante con anterioridad a la infusión de células CART19.

Tres días después de la quimioterapia pero con anterioridad a la infusión celular, la medula ósea fue hipercelular (60%) con una participación aproximada del 40% por CLL. En razón de las limitaciones de manufactura inherentes a la recolección de aféresis a partir del CLL los pacientes como puede observarse en la Tabla 3 y (Bonyhadi y al; 2005, J immunol 174:2366-2375), el paciente fue infundado con

137

un total de 1.46×10^5 células CART19+ /kg (1.42×10^7 total CART19+ células) por espacio de tres días. No se registraron toxicidades por infusión. 14 días después de la primera infusión, el paciente empezó a tener escalofríos, fiebres hasta de 102°F, temblores, náusea y diarrea que se trataron en forma sintomática. El paciente no presentó síntomas respiratorios o cardíacos. El día 22 después de la infusión, se diagnosticó síndrome de lisis tumoral que se manifestó por un LDH elevado, ácido úrico y complicaciones por insuficiencia renal. El paciente fue luego hospitalizado y tratado con resucitación por fluidos y rasburicase con normalización rápida del ácido úrico y función renal. Se hizo una evaluación clínica en detalle con CXR, sangre, orina, y cultivos de materias fecales y todos los datos fueron negativos o normales.

Dentro de un mes siguiente a las infusiones de CART19, el paciente presentó evacuación del CLL circulante a partir de la sangre y de la médula ósea por morfología, citometría de flujo, citogenética y análisis FISH y los scan CT mostraron solución de adenopatía anormal (Figura 5C). La remisión del paciente se ha sostenido más allá de 8 meses a partir de la infusión celular de CART19.

Los resultados de los experimentos se describen a continuación.

Protocolo Clínico

300

Tres pacientes con CLL avanzado, resistente a la quimioterapia, fueron registrados en un estudio clínico piloto como se aprecia en la Figura 1. Todos los pacientes fueron previamente tratados de manera extensiva con varios regímenes de quimioterapia y biológicos como se aprecia en la Figura 10. Dos de los pacientes presentaron CLL deficiente p53, que es una eliminación que arroja una respuesta pobre a la terapia convencional y al avance rápido (Dohner et al., 1995, Blood, 851580-1589). Cada uno de los pacientes registro cargas tumorales grandes luego de la quimioterapia preparativa, incluyendo infiltrado extenso de medula (40 al 95%) y limfadenopatía; el paciente UPN 02 también tuvo linfocitosis periférica significativa. Las células CART19 T se prepararon como se aprecia en la Figura 1B y los detalles de la caracterización de elaboración y del producto celular para cada paciente se pueden apreciar en la Tabla 4. Todos los pacientes fueron previamente tratados 1 – 4 días antes de las infusiones celulares CART19 con quimioterapia linfoagotadora. Se utilizó un plan de infusión celular de dosis dividida por cuanto el ensayo prueba un CAR que incorpora un dominio de señalización costo-estimulador 4-1BB como se aprecia en la Figura 1 A.

Tabla 4: Productos aféresis y criterios de liberación del producto CART19

	Ensayo	Especificación	UPN 01	UPN 02	UPN 03
Producto de					

30

Aferesis					
	Citometria de flujo para CD3+ o CD45+	N/A	4.45%	2.29%	2.67%
Producto CART19					
	No. total infundido de células	$\sim 2.5 \times 10^8$	5×10^8	1.275×10^8 1.275×10^9 (2.55×10^9 total)	3×10^8
	Viabilidad celular	$\geq 70\%$	96.2%	95.3 (90.5)	90.3
	% CD3+ Células	$\geq 80\%$	88.9%	98.8	98.9
	Esfera residual #	≤ 100 esferas/ 3×10^6 células	3.95	1	4
	Endotoxinas	≤ 3.5 EU/ml	< 0.5 EU m/l	< 0.5 EU m/l	< 0.5 EU/ml
	Micoplasma	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Esterilidad	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento
	Cultivo Fungal	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento
	BSA ELISA	< 1 ng/ml	< 0.5 ng/ml	< 0.5 ng/ml	< 0.5 ng/ml

140

	Lentivirus competente de replicacion (RCL)	RCL no detectable	RCL no detectable	Inclusive	inclusive
	Eficiencia de Transducción (expresión scFv)	≥ 20%	22.6%	23%	4.74%
	Secuencia ADN de vector (CART19 PCR)	0.2 3 Copias/ celula	0.15	0.275	0.101

1= Dosis # 2

2= Valor de ensayo el día 12 por debajo de LOQ que se había disminuido a partir de expansión consistente con el traslado de AND plásmido a partir de la generación de vectores. Presentado a la FDA como modificación de información.

3= Liberación del producto con base en la tinción de superficie por FACS

4= Excepción de tratamiento que se otorga para criterios de liberación por DSMC e IRB externos.

Expansión y persistencia in vivo de CART19 y traslado a medula ósea

141

Las células CAR+ T se expandieron utilizando esferas CD3/CD28 y expresando un dominio de señalización 4-1BB que se considera una mejora con respecto de los CARs carentes de 4-1BB. Se desarrollo un estudio Q-PCR para permitir el seguimiento cuantitativo de la célula CART19 en medula ósea y sangre. Todos los pacientes tuvieron expansión y persistencia de las células CART19 en sangre durante 6 meses como mínimo como puede apreciarse en las Figuras 2 A y 2C. Es de notar que los pacientes UPN 01 y UPN 03 tuvieron una expansión de 1000 hasta 10.000 veces de células CAR+ T en sangre durante el primer mes post-infusión. Los niveles pico de expansión coincidieron con la aparición de los síntomas clínicos post-infusión en el paciente UPN 01 (día 15) y el paciente UPN 03 (día 23). Además de lo anterior, a partir de un descenso inicial que puede modelarse con cinética de primer orden, los niveles de célula CART19 T se estabilizaron en todos los tres pacientes desde el día 90 hasta el 180 post-infusión. Es de notar que las células CART19 T se trasladaron también a la medula ósea en todos los pacientes, a pesar que se registraron 5 a 10 veces niveles más bajos a los observados en sangre como puede apreciarse en la Figura 2D hasta 2F. los pacientes UPN 01 y UPN 03 tuvieron un descenso lineal en la medula, con una desaparición de $T_{1/2}$ de ~35 días.

Inducción de respuestas inmunes específicas en los compartimentos de sangre y medula ósea a partir de la infusión de CART 19

142

Las muestras de suero provenientes de todos los pacientes se recogieron y el batch se analizo para determinar cuantitativamente los niveles de citoquina, evaluando un panel de citoquinas, quimioquinas y otros factores solubles para evaluar las toxicidades potenciales y proporcionar evidencia de la función celular CART19 como se puede apreciar en la Figura 3. De un total de 30 analitos probados, 11 presentaron tres veces o mas de cambios a partir de la línea basal, incluyendo 4 citoquinas (IL-6, INF- γ , IL-8 E IL-10), 5 quimoquinas (MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, CXCL9, CXCL10), y receptores solubles para IL-1R α y IL-2R α . De estos, el interferon γ presentó el cambio relativo mayor a partir de la línea basal. Lo interesante en este caso es que el tiempo pico de la elevación de citoquina en UPN 01 y UPN 03 se correlacionaron temporalmente con los síntomas clínicos descritos anteriormente y con los niveles pico de células CART19 en sangre en cada uno de los pacientes. Solamente se registraron cambios leves en el paciente UPN 02, posiblemente como resultado del tratamiento con corticosteroides que se le aplicó a este paciente. La elevación del IL-2 soluble no se detecto en el suero de los pacientes, aun cuando uno de los fundamentos preclínicos para desarrollar las células CAR+ T con dominios de señalización 4-1 BB se redujo por propensión a desencadenar secreción IL-2 en comparación con los dominios de señalización CD28 (Milone et al., 2009, Mol Ther. 17:1453-1464). Lo anterior puede ser relevante para la actividad clínica sostenida ya que los estudios clínicos han demostrado que las células CAR+ T se suprimen potencialmente por las células regulatorias (Lee et al., 2011, Cancer Res 71:2871-2881), que son células que podrían elicitar por los CARs que secretan cantidades sustanciales de IL-2 o por

193

la provisión de IL-2 exógeno post-infusión. Finalmente, una infusión robusta de secreción de citoquina en los superlactantes a partir de los aspirados de medula ósea de UPN 03 se observó como se muestra en la Figura 3D que también coincidió con el desarrollo del síndrome de lisis tumoral y remisión completa.

Expresión y establecimientos prolongados de una población de células de memoria CART 19 en sangre

Un tema central en la inmunoterapia de cáncer mediada por CAR es si los dominios de fabricación y coestimulación celular optimizados mejoran la persistencia de células T genéticamente modificadas y permiten el establecimiento de células T de memoria CAR⁺ en pacientes. Los estudios previos no han demostrado gran expansión, persistencia prolongada y/o extensión de CARs en células T después de la infusión (Kershaw et al., 2006, Clin Cancer Res 12:6106-6115; Lamers et al., 2006 J Clin Invest doi: 10.1172/JCI46110). El análisis citométrico de flujo de las muestras tomadas de sangre y medula al cabo de 169 días post-infusión reveló la presencia de células de expresión CAR 19 en UPN 03 (Figuras 4^a y 4B) y ausencia de células B como se aprecia en la Figura 4^a. Es de observarse que de acuerdo con el ensayo Q-PCR, todos los tres pacientes tienen células persistente CAR⁺ a los 4 meses y posteriormente como se aprecia en la Figura 2 y Figura 6. La frecuencia in vivo de las células CAR⁺ por citometría de flujo se acopló íntimamente con los valores obtenidos a partir del ensayo PCR para el transgene CAR19. Es importante tener en cuenta que para el paciente

749

UPN 03, solamente las células CD3⁺ expresaron el CAR19, ya que las células CAR19⁺ no fueron detectables en CD16 o CD14 de los sub-conjuntos positivos como se aprecia en la Figura 4A. La expresión CAR también se detectó en la superficie de 4.2% de células T en sangre del paciente UPN 01 el día 71 post-infusión como se observa en la Figura 7.

Luego, la citometria de flujo policromático se usó para realizar estudios detallados para caracterizar aun más la expresión, fenotipo y función de las células CART19 en UPN 03 utilizando un anticuerpo idiótipo anti-CAR (MDA-647) y una estrategia de división por compuertas que se observa en la Figura 8. Las diferencias notables en la expresión de memoria y marcadores de activación tanto en CD8⁺ como en CD4⁺ se basó en la expresión CAR19 según se observó. El día 56, las células CART19 CD8⁺ desplegaron esencialmente un fenotipo de memoria efector (CCR7-CD27-CD28-) en concordancia con la exposición prolongada y robusta para el antígeno como se aprecia en la Figura 4C. A manera de contraste, el CAR- negativo CD8⁺ de las células consistió en mezclas de efector y células de memoria central, con expresión CCR7 en un sub-conjunto de células y números sustanciales en las fracciones CD27⁺/CD28 y CD27⁺/CD28⁺. Si bien las poblaciones celulares CART19 y CAR-negativas expresaron sustancialmente CD57, esta molecular se co-expresó en forma uniforme con PD-1 en las células CART19, lo cual es un reflejo posible de la extensa historia de replicación de estas células. En forma contrastada con la población celular negativa CAR, la totalidad de la población CART19 CD8⁺ carencia de expresión de CD25 y CD127. El día

123

169, mientras el fenotipo de la población celular negativa CAR continuaba similar a la muestra del día 56, la población CART19 había evolucionado para que contuviera una población minoritaria con características de células de memoria central, notablemente expresión de CCR7, niveles más elevados de CD27 y CD28, al igual que células CAR+ que fueron PD-1 negativas, CD 57 negativas y CE127 positivas.

En el compartimento CD4+, el día 56 se caracterizaron las células CART19 por la carencia uniforme de CCR7 y predominancia de células CD27/CD28/PD-1+ distribuidas al interior de CD57+ y los compartimentos, además de una ausencia esencial y la expresión CD25 y CD127 como se muestra en la Figura 4B. Por contraste, las células negativas CAR en este momento fueron heterogéneas en cuanto a la expresión CCR7, CD27 y PD-1, que expresaron CD127 y contenían además una población sustancial CD25+/CD127- (células T regulatorias y potenciales). Para el día 169, mientras la expresión CD28 continuaba uniformemente positiva en todas células CAR+CD4+, una fracción de las células CRT19 CD4+ había evolucionado hacia un fenotipo de memoria central con expresión de CCR7, que es un porcentaje mayor de la célula CD27, con aparición de un subconjunto negativo CD-1 y adquisición de la expresión CD127. Las células negativas CAR continuaron razonablemente consistentes con sus contrapartes del día 56, con excepción de una reducción en la expresión CD27 y una disminución en el valor porcentual de la célula CD25+/CD127.

126

Las células CART19 pueden conservar la función efectora después de 6 meses en sangre

Además de la corta persistencia y la inadecuada proliferación in vivo, una limitación de los ensayos previos con células CAR+ T constituyó la rápida pérdida de actividad funcional de las células infundidas T in vivo. La persistencia de células CART19 de alto nivel y la expresión de superficie de la molécula CAR19 en el paciente UPN 01 y 03 proporcionaron la oportunidad de probar en forma directa las funciones del efector específico anti-CD19 que se recuperó a partir de las muestras de sangre periférica crioconservadas. El PBMC proveniente del paciente UPN 03 se cultivó junto con las células blanco que fueron positivas o negativas para la expresión CD19 (Figura 4D). La función efectora específica y robusta de CD19 de las células CART19 T se demostró mediante la desgranulación específica contra positiva CD19 pero no con respecto de las células blanco negativas CD19-, de acuerdo con la evaluación hecha por expresión CD107a de superficie. Es de notar que la exposición de la población CAR19 a los blancos positivos CD19 indujo una internalización rápida de CAR-19 de superficie como se puede apreciar en la Figura 8 para la expresión de superficie de CAR19 en las mismas células efectoras en tinción de citometría estándar de flujo. La presencia de moléculas co-estimuladoras en las células blanco no se requirió para desencadenar la desgranulación de las células CART19 por cuanto la línea NALM-6 no expresa CD80 ni CD86 (Brentjens et al., 2007, Clin Cancer Res 13:5426-5435). La función efectora fue evidente el día 56 post

147

infusión y se retuvo en el tiempo el día 169. La función efectora robusta de células CAR+ y CAR-T pudo también demostrarse mediante estimulación farmacológica.

Actividad clínica de las células CART19

No se registraron toxicidades significativas durante los 4 días siguientes a la infusión en un paciente, distinta de las reacciones febriles transitorias. Sin embargo, todos los pacientes desarrollaron posteriormente toxicidades clínicas y de laboratorio en forma significativa entre el día 7 y 21 a partir de la primera infusión. Estas toxicidades fueron de corto plazo y reversible. De los tres pacientes tratados hasta la fecha, hay 2CRs y 1PR a > 6 meses post-infusión CART19 de acuerdo con criterios estándar (Halck et al., 2008, Blood 111:5446). Los detalles de la historia médica y respuesta a la terapia para cada paciente se observan en la Figura 10.

En breve, el paciente UPN 01 desarrollo un síndrome febril, con rigores e hipotensión transitoria partir de los 10 días después de la infusión. Las fiebres persistieron durante 2 semanas aproximadamente y luego se resolvieron; el paciente no ha tenido ningún otro síntoma constitucional posterior. El paciente logro una respuesta rápida y completa como se observa en la Figura 5. Entre 1 y 6 meses después de la infusión, no se han detectado células circulantes CLL en la sangre por medio de citometría de flujo. La medula ósea al cabo de 1, 3 y 6 meses después de las infusiones celulares CART19 muestra una ausencia

149

sostenida del infiltrado linfocítico por morfología y análisis citométrico de flujo según se observa en la Figura 5B. Los scan CT al cabo de 1 y 3 meses después de la infusión muestran resolución de adenopatía como lo muestra la Figura 5C. La remisión total se sostuvo por espacio de 10+ meses en el momento del presente informe.

El paciente UPN 02 fue tratado con 2 ciclos de bendamustina con rituximab dando como resultado estabilidad en la enfermedad como se aprecia en la Figura 5 A. el paciente recibió una tercera dosis de bendamustina como quimioterapia linfagotadora antes de la infusión celular CART19 T. El paciente desarrolló fiebres hasta de 40°C, temblores y disnea que requirieron de hospitalización de 24 horas del día 11 después de la primera infusión y en el día del segundo aumento celular CART19. Las fiebres y síntomas constitucionales continuaron y en el día 15, el paciente presentó disfunción cardíaca transitoria; todos los síntomas se resolvieron después de iniciarse la terapia con corticosteroides el día 18, después de la infusión CART19, y coincidente con la aparición de altas fiebres, el paciente tuvo una rápida evacuación de las células CLL deficientes de p53 a partir de la sangre periférica según se aprecia en la Figura 5 A y una reducción parcial de adenopatía, donde la médula ósea mostró infiltración persistente extensiva de CLL un mes después de la terapia a pesar de la cito reducción dramática de la sangre periférica. El paciente continúa asintomático.

1/10/09

El paciente UPN 03 recibió pentostatin y ciclofosfamida como quimioterapia linfagotadora antes de infusión celular CART19. Tres días después de la quimioterapia pero con anterioridad a la infusión celular, la médula ósea fue hipercelular (60%) con participación de aproximadamente el 50% de CLL. El paciente recibió una baja dosis de CART19 (células 1.5×10^5 CAR+ T/kg divididas por 3 días). Nuevamente, no se registro ninguna toxicidad infusional aguda. Sin embargo, 14 días después de la infusión primera, el paciente empezó a tener temblores, fiebres, náusea y diarrea. Para el día 22 después de la infusión, se diagnosticó síndrome de lisis tumoral que requirió hospitalización. El paciente tuvo resolución de síntomas constitucionales, y dentro de un mes siguiente a las infusiones CART19, el paciente tuvo evacuación de CLL circulante a partir de la sangre y médula ósea por medio de morfología, citometría de flujo, citogenética y análisis FISH. Los scan CT mostraron resolución de adenopatía anormal según se aprecia en las Figuras 5B y 5C. Se sustentó la remisión completa con posterioridad a 8 meses a partir de la infusión celular inicial con CART19.

Consideraciones del efector CART19 in vivo con respecto de la proporción celular blanco CLL

Los estudios preclínicos mostraron que los tumores de gran tamaño podrían reducirse y que la infusión de 2.2×10^7 podría erradicar tumores conformados por células de 1×10^9 , para la proporción E: T in vivo de 1:42 en ratas machos humanizadas (Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106:3360-3365) aun

150

cuando estos cálculos no tuvieron en cuenta la expansión de la célula T después de la inyección. Los estimativos de la carga tumoral CLL con el tiempo permitieron el cálculo de reducción tumoral y las proporciones estimadas E: T de CART19 alcanzadas in vivo en los tres sujetos con base en el número de células CAR+ T se infundieron. Las cargas tumorales se calcularon midiendo la carga CLL en medula ósea, sangre y tejidos linfoides secundarios. Las cargas tumorales de línea basal como se aprecia en la Figura 10 indican que cada paciente tuvo células del orden de 10^{12} CLL (es decir 1 kg de carga tumoral) antes de la infusión CART19. El paciente UPN 03 tuvo un estimativo de tumor de línea basal con una carga de 8.8×10^{11} células CLL en medula ósea el día 1 (es decir posterior a la quimioterapia e infusión pre-CART19) y una masa tumoral medida en tejidos linfoides secundarios de $3.3-5.5 \times 10^{11}$ células CLL, de acuerdo con el método de análisis volumétrico de scan CT. Dado que se infundió el UPN 03 con tan solo 1.4×10^7 células CART19, utilizando el estimativo de la carga tumoral total inicial (1.3×10^{12} células) y que ninguna de las células CLL son detectables post-tratamiento, se logró una sorprendente proporción E:T de 1:93,000. Mediante cálculos similares, se estableció una proporción eficaz E:T in vivo de 1:2200 y 1:1000 para UPN 01 y UPN 02 como se aprecia en la Tabla 3. Al final, un aporte de eliminaciones seriales por células CART19 en combinación con la expansión in vivo de CART19 de > 1000 veces contribuyó probablemente a los efectos potentes anti-leucémicos mediados por las células CART19.

151

Células T expresan receptores quiméricos y establecen efectos antitumorales potentes y de memoria en pacientes con Leucemia avanzada

La expresión limitada in vivo y la función efectora de CARs ha sido una limitación central en los estudios de prueba de CARs de primera generación (Kershaw et al., 2006, Clin Cancer Res 12:6106-6115; Lamers et al., 2006, J Clin Oncol 24:e20-e22; Till et al., 2008, Blood, 112, 2261-2271; Park et al., 2007, Mol Ther 15:825833; Pule et al., 2008, Nat Med 14:1264-1270). Con base en la modelación preclínica que demuestra una persistencia mejorada de CARs que contienen un modulo de señalización 4-1 BB (Milone et al., 2009, Mol Ther, 17:1453-1464; Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106:3360-3365), se diseñaron experimentos para desarrollar una segunda generación de CARs modificados con tecnología de vector lentiviral. Esta segunda generación de CARs demostró ser segura en el establecimiento de la infección crónica por VIH (Levine et al., 2006, Proc Natl Acad Sci USA 103:17372-17377). Estos resultados muestran que cuando esta segunda generación CAR se expreso en células T y se cultivo bajo condiciones diseñadas para promover injertos de células de memoria central T (Rapoport et al., 2005, Nat Med 11:1230-1237; Bondanza et al., 2006, Blood 107:1828-1836), se observo una expansión mejorada de células CAR T después de la infusión, en comparación con los informes previos. Las células CART19 establecieron memoria celular especifica CD19 y eliminaron células tumorales en proporciones E:T in vivo que no se habían logrado anteriormente.

152

El CART19 es el primer ensayo CAR que incorporo un dominio de señalización 4-1BB y el primero en utilizar la tecnología de vectores lentivirales. Los resultados presentes demuestran seguimiento eficiente de CARs hacia los sitios del tumor, con establecimiento de facto de "linfocitos de infiltración tumoral" que muestran especificidad CD19. La pronuncia de expansión in vivo permitió la primera demostración en el sentido que los CARs recuperados directamente de pacientes pueden conservar la función efector in vivo durante varios meses. Un estudio previo había sugerido que la introducción de un CAR de primera generación en las células T específicas de virus es preferible a las células primarias T (Pule et al., 2008, at Med 14:1264-1270), sin embargo los resultados con los CARs de segunda generación introducidos en células T primarias óptimamente co-estimuladas invita a cuestionar este mismo tema. Sin aferrarse a una teoría en particular, se elevo una nota de advertencia en el sentido que los efectos clínicos fueron profundos y sin precedentes con respecto de la lisis de cargas tumorales dimensionadas en kilogramos en todos los tres pacientes acompañados con la liberación retardada de niveles altos potencialmente peligrosos de citoquinas en dos de los pacientes. Los efectos de ataques de citoquinas clásicos no se observaron. Sin embargo este estudio se diseño para mitigar esta posibilidad por medio de la infusión a propósito de CART19 en un periodo de tres días.

Se pudo establecer que dosis muy bajas de CARs pueden disparar respuestas clínicas potentes. Se trata de un estudio piloto que demostró seguridad del diseño de vectores CART19. La observación en el sentido que las dosis de células

57

CART19 con varias órdenes de magnitud por debajo de las probadas en ensayos previos puedan tener beneficios clínicos podrá aportar implicaciones importantes para la implementación futura de la terapia CAR a una escala mucho mayor e incluso servirá para el diseño de ensayos que manejen los CARs dirigidos contra los objetivos distintos de CD19.

Estos estudios indican además que el CART19 se expresa en memoria central y células efectoras T, lo cual tiene probabilidades de contribuir a su supervivencia de largo plazo en comparación con los informes previos. Sin adherirse demasiado a una teoría en particular, las células CAR T pueden diferenciarse en vivo dentro de un estado central similar al de memoria en el momento del encuentro y posterior eliminación de las células blanco, (es decir células tumorales CLL o células normales B) que expresan el antígeno subrogado. En realidad la señalización de 4-1BB se ha reportado en el sentido de promover el desarrollo de memoria dentro del contexto de señalización TCR (sabbagh et al., 2007, Trends Immunol 28:333-339).

La proliferación y supervivencia extendida de CART19 revelo aspectos de la farmacocinética de las células CAR T que no se habían reportado con anterioridad. Se pudo observar que la cinética de la liberación de citoquina en suero y medula se correlacionaba con los niveles pico CART19, de tal suerte que es posible que el deterioro se inicie cuando los blancos celulares que expresan CD19 se limiten. El mecanismo de la supervivencia extendida de CART19 puede

159

relacionarse con la incorporación antes mencionada del dominio 4-1BB o con la señalización a través del TCR natural y/o CAR. Una posibilidad que preocupa es que la sobrevivencia extendida se relacione con la población de CART19 que se identifico en muestras de medula, dando lugar a la hipótesis que CD19 CARs podría mantenerse mediante encuentro con progenitores de células B en medula ósea. En relación con este tema cabe preguntarse ¿qué es lo que impulsa la expansión inicial de las células CART19 in vivo? Con raras excepciones (Savoldo et al., 2011, J Clin Invest doi: 10.1172/JC146110; Pule et al., 2008, Nat. Med 14:1264-1270), este estudio es el único ensayo que omitió infusiones IL-2, de tal suerte que las células CART19 probablemente se expandieron en respuesta a las citoquinas homeostáticas o más probablemente, a la CD19 expresada en **blancos** leucémicos y/o células B normales. En el último de los pasos, esto podría ser una característica atractiva para los CARs dirigidos contra blancos en APCs normales tales como CD19 y CD20, ya que es posible que la autorenovación de CART19 ocurra en células normales, proporcionando así un mecanismo para la memoria CAR por medio de la "autovacunación/elevación" y por lo tanto, la inmunosupervisión de tumores a largo plazo. Los mecanismos de homeostasis CART19 pueden requerir estudios posteriores para mostrar los mecanismos intrínsecos y extrínsecos celulares de persistencia. Con anterioridad a estos resultados, la mayoría de los investigadores han observado la terapia CAR como una forma transitoria de inmunoterapia, sin embargo los CARs con dominios optimizados de señalización pueden desempeñar un rol en cuanto a la inducción de remisión y consolidación al igual que en la inmunovigilancia de largo plazo.

153

Los potentes efectos anti-leucémicos han sido observados en todos estos tres pacientes, incluyendo dos de ellos con leucemia deficiente p53. Los estudios previos con CARs han tenido dificultad en separar el efecto anti-tumoral de la terapia linfagotadora. Sin embargo, la liberación retardada de citoquina se combinó con la cinética de lisis tumoral en pacientes refractarios a la fludarabina lo cual fue coincidente y posiblemente dependiente de la expansión CAR in vivo en el presente estudio, lo cual indica que CART19 actúa como mediador de efectos anti-tumorales potentes. Estos resultados no excluyen un papel que se desempeñe en cuanto a la quimioterapia en el manejo de potenciación de los efectos de CARs.

Una comparación completa de el vector, del transgene y de los procedimientos de manufactura celular con resultados a partir de los estudios que se realizan en otros centros pueden requerirse con el fin de obtener un mayor entendimiento de las características claves que se necesitan para obtener la función sostenida de las células CAR T in vivo. A diferencia de las terapias con anticuerpos, las células T modificadas por CAR tienen el potencial de replicarse in vivo, y la persistencia a largo plazo podría conducir al control sostenido de tumores. La disponibilidad de una terapia pre-establecida conformada por células T eliminadoras, resistentes y no transversales tendrá el potencial de mejorar el resultado de pacientes con condiciones malignas de células B. Una de las limitaciones de la terapia con anticuerpos, por ejemplo aquella que utiliza agentes como el rituximab y

156

bevacizumab, es la terapia que exige infusiones repetidas de anticuerpos, lo cual es inconveniente y altamente costoso. La administración de terapia prolongada con anticuerpos (en este caso durante 6 meses como mínimo en 3 de los 3 pacientes tratados hasta la fecha) con scFv anti-CD19 expresado en células T a partir de una sola infusión de células CART19 presenta una serie de ventajas prácticas, entre las cuales están las conveniencias y reducción de costos.

Ejemplo 2: Receptor de Antígeno Quimérico – Células T modificadas en Leucemia Linfocítica Crónica

Un vector lentiviral que expresa un receptor de antígeno quimérico con especificidad para el antígeno celular B, CD19, se acoplo con CD137 (un receptor co-estimulador en células T (4-1BB)) y CD3-zeta (componente de transducción de señal del receptor de antígeno celular T) con dominios de señalización, se diseñó para este ejemplo. Se pudo observar que una dosis baja (aproximadamente 1.5×10^5 células por kilogramo de peso corporal) de células T modificadas por el receptor, antígenas quiméricas y autologas se reinfundieron a un paciente con leucemia linfocítica crónica y refractaria (CLL) expandiéndose hacia un nivel que fue superior a 1000 veces el nivel de injerto inicial in vivo. Se observó igualmente que el paciente mostró un desarrollo retardado del síndrome de lisis tumoral y remisión total.

157

Además del síndrome de lisis tumoral, el único efecto toxico de grado $\frac{3}{4}$ que se relaciono con las células T del receptor antígeno quimérico fue la linfopenia. Las células modificadas continuaron a altos niveles durante 6 meses como mínimo en sangre y medula ósea y continuaron expresando el receptor antígeno quimérico. Se detecto una respuesta inmune específica de medula ósea, acompañada de pérdida de células normales B y células de leucemia que expresan el CD19. La remisión fue permanente 10 meses después del tratamiento. La hipogamaglobulinemia fue un efecto toxico y crónico esperado.

Los materiales y métodos utilizados en estos experimentos se describen a continuación.

Materiales y Métodos

Procedimientos del Estudio

Se diseño un vector lentiviral auto-inactivante (GeMCRIS 0607-793), el cual se sometió a pruebas pre-clínicas de seguridad, según los informes previos (Milone et al., 2009, Mol Ther, 17:1453-64). Los métodos de preparación de células T también se describieron previamente (Porter et al, 2006, Blood, 107:325-31). Se realizo el análisis de reacción de cadena de polimerasa cuantitativa (PCR) para detectar células receptoras del antígeno quimérico en sangre y medula ósea. El limite menor de cuantificación se determino a partir de la curva estándar, y los

150

valores promedios por debajo del límite inferior de cuantificación se consideran como aproximados (es decir, son reportables pero no cuantificables). El límite inferior de cuantificación del estudio fue de 25 copias por microgramo de ADN genómico.

Se realizó el análisis de factor soluble utilizando suero proveniente de sangre entera y medula ósea que se separo en alícuotas para un solo uso y se almaceno a -80°C. la cuantificación de factores solubles de citoquina se realizo utilizando tecnología de serie de esferas luminex y reactivos (Life Technologies).

Aferesis #1

Se lleva a cabo un procedimiento de aféresis de 12 – 15 litros en el centro especializado. Se obtienen las células mono-nucleares de sangre periférica (PBMC) para la generación de células CART-19 T durante este procedimiento. A partir de una sola leucoferesis, se cultivan por lo menos 50×10^9 células de glóbulos blancos para manufacturar las células CART19 T. Se obtienen y criopreservan además los leucocitos de sangre de línea basal.

Quimioterapia Citroreductiva

Se inicia la quimioterapia aproximadamente a los 5 – 10 días antes de la infusión, de tal suerte que las células CART-19 pueden entregarse 1 – 2 días después de

159

terminar la quimioterapia. La programación de inicio de esta práctica dependerá por lo tanto de la duración del régimen. El objetivo de la quimioterapia consiste en inducir linfopenia para facilitar el injerto y expansión homeostática de células CART-19. La quimioterapia puede escogerse además para reducir la carga tumoral de la enfermedad. La quimioterapia citoreductora se escoge y administra por parte de oncólogos de la comunidad. La escogencia de quimioterapia depende de la enfermedad subyacente del paciente y de terapias anteriores. La Fludarabina (30 mg/m²/día x 3 días) y la ciclofosfamida (300 mg/m²/día x 3 días) son los agentes de selección, ya que existe el máximo de experiencia con el uso de estos agentes en la facilitación de la inmunoterapia adoptiva. Existen algunos otros regímenes aceptables que utilizan medicamentos aprobados por la FDA y que son apropiados como CHOP, HiperCVAD, EPOCH, DHAP, ICE u otros regímenes.

Establecimiento de la Evaluación

Se realiza una re-evaluación limitada al finalizar la quimioterapia con el propósito de obtener mediciones de carga tumoral básicas. Este procedimiento incluye imágenes, exámenes físicos y evaluaciones mínimas de enfermedad residual (MRD). A los sujetos se les somete a las siguientes pruebas previas a la infusión: examen físico, documentación de eventos adversos y tomas de sangre para hematología, química y prueba de embarazo (si es pertinente).

160

Preparación de células CART-19 T

Las células autólogas T se modifican para expresar un anticuerpo extracelular de una sola cadena (scFv) con especificidad para CD19. El scFv extracelular podrá redirigir la especificidad de las células T transducidas para aquellas células que expresan CD19, es decir una molécula que se restringe en expresión sobre la superficie de células malignas y sobre células normales B. adicionalmente al CD19 scFv, las células se transducen para expresar una molécula de señalización intracelular conformada por la cadena TCR ζ o un dominio de señalización tándem conformado por módulos de señalización 4-1BB y TCR ζ . El scFv se deriva a partir de un anticuerpo monoclonal de rata, y en estas condiciones contiene las secuencias de rata, y los dominios de señalización corresponden totalmente a las secuencias humanas nativas. Las células CART-19 T son elaboradas mediante el aislamiento de células T por aféresis, utilizando además la tecnología de vectores lentivirales (Dropulic et al., 2006, Human Gene Therapy, 17:577-88; Naldini et al., 1996, Science, 272:263-7; Dull et al., 1998, J Virol, 72:8463-71) para introducir el scFv: TCR ζ :4-1BB dentro de CD4 y células CD8 T. En algunos pacientes, se introduce un control scFv: TCR ζ dentro de una porción de las células para realizar experimentos competitivos de repoblación. Estos receptores son “universales” en el sentido que se unen al antígeno de una manera independiente del MHC y de esta manera un constructo receptor se puede utilizar para tratar una población de pacientes que tengan tumores positivos de antígeno CD19.

161

Los constructos CAR fueron desarrollados en la Universidad de Pensilvania y se elaboro el vector grado clínico en Lentigen Corporation. Las células CART-19 se elaboran en las instalaciones denominadas Clinical Cell and Vaccine Production Facility de la Universidad de Pensilvania de acuerdo con el proceso que aparece en la Figura 11. Al finalizar los cultivos celulares, las células son crioconservadas en criomedios infusibles. Una sola dosis de CART-19 de células T transducidas que comprenda la infusión de 205×10^9 hasta 5×10^9 del total de células, se administran una o dos bolsas. Cada una de estas bolsas contiene una alícuota (volumen que depende de la dosis) de criomedios que contienen los siguientes reactivos de grado infusible (% v/v): 31.25 plasmalyte-A, 31.25 dextrosa (5%), 0.45 NaCl, hasta 7.50 DMSO, 1.00 dextran 40, 5.00 de albumina de suero humano con aproximadamente $2.5-5 \times 10^9$ células autologas T por bolsa. Para mayor seguridad, se aplica la primera dosis como dosis dividida los días 0, 1 y 2 con ~10% de las células el día 0, 30% el día 1 y 60% el día 2.

Almacenamiento

Las bolsas (con capacidad de 10 a 100 ml) que contienen células T transducidas CART-19 se almacenan en condiciones de banco de sangre en un congelador monitoreado a temperatura de -135°C . Las bolsas de fusión se almacenan en el congelador hasta cuando se necesiten.

Descongelación de Células

162

Después de registrar las células en la farmacia de investigaciones, las células congeladas se trasplantan en hielo seco a la cama del sujeto. Estas células son descongeladas en el lado de la cama una por una utilizando un baño de Maria que se mantiene a la temperatura de 36°C hasta 38°C. La bolsa se masajea suavemente hasta cuando las células se descongelen. No deben registrarse grumos congelados dentro del contenedor. Si el producto celular CART-19 presenta signos de avería o fugas en la bolsa, o alguna otra afectación, no debe hacerse la infusión.

Premedicación

Los efectos colaterales posteriores a la infusión con células T pueden ser entre otros fiebres transitorias, escalofríos y/o náusea. Se recomienda que se premedique el sujeto con acetaminofen 650 mg vía oral e hidrocloreuro de difenidramina 25-50 mg oral o por vía intravenosa, antes de la infusión de las células CART-19. Estos medicamentos se pueden repetir cada 6 horas según se requiera. Se puede sin embargo prescribir una serie de medicamentos anti-inflamatorios no esteroides si el paciente continúa presentando eventos de fiebre que no se alivian con la aplicación del acetaminofen. Se recomienda que los pacientes no reciban corticosteroides sistémicos como hidrocortisona, prednisona, prednisolona (Solu-Medrol) o dexametadona (Decadron) en ningún momento, excepto si existe una condición de emergencia amenazante de la vida, ya que esto

(63)

puede tener un efecto adverso sobre las células T. si se requieren corticosteroides para el manejo de una reacción infusional aguda, se recomienda una dosis inicial de hidrocortisona de 100 mg.

Administración/Infusión

Las infusiones empiezan 1 a 2 días después de terminar la quimioterapia. El día de las primeras infusiones, los pacientes presentan un CBC con diferencial y evaluación de CD3, CD4 y CD8 en sus conteos puesto que la quimioterapia se administra en parte para inducir linfopenia. Sin aferrarse a una teoría en particular, se considera que una dosis inicial por vía intravenosa de $2.5-5 \times 10^9$ de células CART-19 es lo óptimo para cumplir con este protocolo. En razón a que existen aproximadamente 1×10^{12} células T en un adulto saludable, la dosis total propuesta es equivalente a 0.5% aproximadamente de la masa corporal total de células T (Roederer, 1995, Nat Med, 1:621-7; Macallan et al., 2003, Eur J Immunol, 33:2316-26). La primera dosis se administra utilizando una dosis dividida en los días cero (10%), 1 (30%) y 2 (60%). Los sujetos reciben infusión en una sala aislada. Las células se descongelan al lado de la cama del paciente, como se describió en otra sección de este mismo documento. Se administran las células descongeladas a una tasa de infusión con la rapidez en que se toleren de tal manera que la duración de la infusión sea de aproximadamente 10 -15 minutos. Las células T transducidas se administran mediante infusión intravenosa rápida a un caudal de aproximadamente 10 ml hasta 20 ml por minuto mediante un set de

TbM

sangre tipo Y libre de látex de calibre 18 con grifo de 3 vías. La duración de la infusión es de aproximadamente 15 minutos. Se entregan de 1 a 2 bolsas de células modificadas CART-19 en hielo, y estas células son administradas al sujeto mientras están frías. En sujetos que reciben mezclas de células CART-19, con el fin de facilitar el mezclado, las células son administradas simultáneamente utilizando un adaptador Y. Los sujetos son infundidos y premedicados como se describió anteriormente. Se toman luego los signos vitales de los sujetos y se hace una oximetría de pulso antes de aplicar la dosificación, al finalizar la infusión y cada 15 minutos de allí en adelante durante 1 hora y hasta cuando estos valores se encuentren estables y satisfactorios. Se obtiene una muestra de sangre para determinar el nivel CART-19 de línea basal antes de la infusión y 20 minutos después de la misma. Los pacientes que muestren toxicidades a partir de su quimioterapia citoreductora precedente tendrán un retardo en su programación de la infusión hasta cuando se hubiesen resuelto dichas toxicidades. Las toxicidades específicas que ameriten el retardo de la infusión celular T son entre otras: 1) Pulmonares: Requerimiento de oxígeno complementario para mantener la saturación superior al 95% o presencia de anomalías radiográficas de rayos X de tórax que sean progresivos; 2) Cardíacos: Nuevas arritmias cardíacas no controladas con manejo médico. 3) Hipotensión que requiera soporte del pressor. 4) Infección Activa: Cultivos de sangre positivos para bacterias, hongos o virus dentro de las 48 horas siguientes a la infusión de células T. Se toma una muestra de suero para determinar potasio y ácido úrico antes de la primera infusión al igual que 2 horas después de cada una de las infusiones posteriores.

165

Pruebas de Laboratorio post-infusión para evaluar condiciones de injerto y persistencia

Los sujetos regresan el día 4 y 10 después de la infusión celular inicial CART-19 para que se les tome muestra de sangre sobre niveles de citoquina en suero, y CART-19 PCR para evaluar la presencia de células CART-19. Los sujetos regresan 1 vez por semana durante 3 semanas para someterse a lo siguiente: examen físico, documentación de eventos adversos y tomas de sangre para hematología, química, injerto y persistencia de células CART-19 y estudios de laboratorio.

Segunda Infusión

Sin adherirse a una teoría en particular, se considera que se puede administrar una segunda dosis de células CART-19 el día 11 a los pacientes, siempre y cuando que muestren una adecuada tolerancia a la primera dosis y que se hubiesen elaborado suficientes células CART-19. La dosis es $2-5 \times 10^9$ células totales. Se puede recolectar una muestra de suero para potasio y ácido úrico dos horas después de la infusión.

Segunda Aferesis

166

Se realiza un procedimiento de aféresis de 2 litros en el centro especializado. Se obtiene PBMC para investigación y crio conservación. A los sujetos se les somete a lo siguiente: examen físico, documentación de eventos adversos y tomas de sangre para hematología, química, injertos y persistencia de células CART-19 y estudios de laboratorio. Además se realiza una reevaluación para mediciones de carga tumoral. Estas pruebas se determinan mediante tipo de enfermedad y se incluyen imágenes, evaluaciones MRD, aspirados de medula ósea y biopsia y/o biopsia de nódulo linfático.

Evaluaciones mensuales 2 a 6 meses post-infusión

Los sujetos regresan cada mes durante los meses 2 a 6 post-infusión celular CART-19. En estas consultas, los sujetos se someten a lo siguiente: medicamento concomitante, examen físico, documentación de eventos adversos y tomas de sangre para hematología, química, injertos y persistencia de células CART-19 y estudios de laboratorio. Se realiza el ensayo ADN VIH los meses 2-6 post-infusión celular CART-19 para excluir presencia de RCL detectable.

Evaluaciones trimestrales hasta por 2 años post-infusión

Los sujetos son evaluados trimestralmente hasta completar 2 años post-infusión. En estas consultas, a los sujetos se les somete a lo siguiente: medicamentos concomitantes, examen físico, documentación de eventos adversos y tomas de

167

sangre para hematología, química, injertos y persistencia de células CART-19 y estudios de laboratorio. Se realiza el estudio ADN VIH en los meses 3 y 6 posteriores a la infusión celular CART-19 para excluir presencia de RCL detectable.

Los resultados de los experimentos se describen a continuación.

Historia de los Pacientes

El paciente recibió un diagnóstico de etapa 1 CLL en 1996. Inicialmente requirió tratamiento después de 6 años de observación con respecto de la leucocitosis progresiva y adenopatía. En 2002, fue tratado con 2 ciclos de rituximab más fludarabina; este tratamiento produjo normalización de los conteos sanguíneos y resolución parcial de adenopatía. En 2006, recibió 4 ciclos de rituximab y fludarabina para el manejo del avance de la enfermedad, nuevamente con normalización de conteos sanguíneos y regresión parcial de adenopatía. Esta respuesta fue seguida por un intervalo libre de progresión de 20 meses y un intervalo libre de tratamiento por dos años. En febrero de 2009, presentó una leucocitosis progresiva rápida y adenopatía recurrente. Su médula ósea fue infiltrada de manera extensa con CLL. El análisis citogenético demostró que 3 de 15 células contenían una eliminación de un cromosoma 17p, y las pruebas de hibridación in situ para fluorescencia (FISH) demostraron que 170 de 200 células presentaron una eliminación que afectaba el TP53 en el cromosoma 17p. El

163

paciente recibió rituximab con bendamustina durante un ciclo y luego tres ciclos adicionales de bendamustina sin rituximab (en razón de una reacción alérgica severa). Este tratamiento produjo tan solo una mejora transitoria en la linfocitosis. La adenopatía progresiva se documento por medio de tomografía computarizada (CT) después de la terapia.

Se recogieron las células autologas T por medio de leucaferesis y crioconservacion. El paciente recibió luego alenteumab (antígeno de superficie celular, de linfocitos maduros, anti-CD52), durante 11 semanas, con mejoría en la hematopoyesis y resolución parcial de adenopatía. En los siguientes 6 meses, presento estabilidad en la enfermedad con participación de medula en forma persistente y extensiva y adenopatía difusa con múltiples nodos linfáticos de 1 a 3. En Juli de 2010, el paciente se registro en los estudios clínicos de fase 1 ce células T modificadas por el receptor antígeno quimérico.

Infusiones Celulares

Las células autologas T provenientes del paciente fueron descongeladas y transducidas con lentivirus para expresar el receptor antígeno quimérico específico CD19 (Figura 12A); luego los identificadores de secuencia para vector lentivirus y secuencias relevantes se muestran en la Tabla 5. Cuatro días antes de la infusión celular, el paciente recibió quimioterapia diseñada para agotamiento de linfocitos (pentostatin a una dosis de 4 mg por metro cuadrado de superficie corporal y

16a

ciclofosfamida a una dosis de 600 mg por metro cuadrado) sin rituximab (Lamanna et al., 2006, J Clin Oncol, 24:1575-81). Tres días después de la quimioterapia pero con anterioridad a la infusión celular, la medula ósea fue hipercelular con participación aproximada de 40% por CLL. Las células de leucemia expresaron cadena ligera capa y CD5, CD19, CD20 y CD23. El análisis citogenico mostro dos clones por separado, ambos produjeron perdida del cromosoma 17 p y del locus TP53. (46, XY, del (17)(P12)[5]/46, XY, der (17)t(17;21)(q10;q10)[5]/46,XY[14]). Cuatro días después de la quimioterapia, el paciente recibió un total de 3×10^8 células T, de las que el 5% se transdujeron, para un total de 1.42×10^7 células transducidas (1.46×10^5 células por kilogramo) divididas en tres infusiones intravenosas diarias consecutivas (10% el día 1, 30% el día 2 y 60% el día 3). No se administraron citoquinas post-infusión; tampoco se registraron efectos tóxicos de infusiones.

Tabla 5: Identificadores de Secuencia para el vector de transferencia pELPS-CD19-BBz

SEQ ID No: #	IDENTIFICACION
SEQ ID No: 1	pELPS-CD19-BBZ sector de transferencia (secuencia de acido nucleico)
SEQ ID No: 2	RSV's (secuencia de ácido nucleico)
SEQ ID No: 3	VIH repetición R (secuencia de ácido nucleico)

170

SEQ ID No: 4	VIH Repetición U5 (secuencia de ácido nucléico)
SEQ ID No: 5	Parcial Gag/Pol (secuencia de ácido nucléico)
SEQ ID No: 6	cPPT (secuencia de ácido nucléico)
SEQ ID No: 7	EFI promotor alfa (secuencia de ácido nucléico)
SEQ ID No: 8	CD19-BB zeta CAR (secuencia de ácido nucléico)
SEQ ID No: 9	Hu Woodchuck PRE (secuencia de ácido nucléico)
SEQ ID No: 10	Repetición R (secuencia de ácido nucléico)t
SEQ ID No: 11	Repetición U5 (secuencia de ácido nucléico)
SEQ ID No: 12	CD19-BB zeta CAR (secuencia de aminoácidos)
SEQ ID No: 13	CD8 Leader (secuencia de ácido nucléico)
SEQ ID No: 14	Anti-CD19scFv (secuencia de ácido nucléico)
SEQ ID No: 15	CD8 Hinge (secuencia de ácido nucléico)
SEQ ID No: 16	CD8 Transmembrana (secuencia de ácido nucléico)
SEQ ID No: 17	4-1BB (secuencia de ácido nucléico)
SEQ ID No: 18	CD3 zeta (secuencia de ácido nucléico)
SEQ ID No: 19	Líder CD8 (secuencia de aminoácidos)
SEQ ID No: 20	Anti CD19 scFv (secuencia de aminoácidos)
SEQ ID No: 21	CD8 Hinge (secuencia de aminoácidos)
SEQ ID No: 22	CD8 Transmembrana (secuencia de aminoácidos)
SEQ ID No: 23	4-1BB (secuencia de aminoácidos)
SEQ ID No: 24	CD3 zeta (secuencia de aminoácidos)

Respuesta

y

Evaluación
es Clínicas

Catorce
días de la
primera
infusión, el
paciente
empezó a
tener

escalofríos y fiebres bajas asociadas con fatiga grado 2. En los siguientes 5 días,

121

se intensificaron los escalofríos y la temperatura del paciente llegó a 39.2°C (102.5°F), asociándose con temblores, diaforesis, anorexia, náusea y diarrea. El paciente no presentó síntomas respiratorios ni cardíacos. En razón de las fiebres, se realizaron radiografías de tórax y cultivos de sangre, orina y materias fecales y todos los resultados fueron negativos o normales. El síndrome de lisis tumoral se diagnosticó el día 22 después de la infusión (Figura 12B). El nivel de ácido úrico fue 10.6 mg/dl (630.5 µmol por litro), el nivel de fósforo fue 4.7 mg/dl (1.5 mmol/l) (rango normal, 2.4 hasta 4.7 mg/dl [0.8 hasta 1.5 mmol/l]) y el nivel de deshidrogenasa de lactato fue de 1130 U/l (rango normal 98 a 192). Se registró prueba de lesión renal aguda, con nivel de creatinina de 2.60 mg/dl (229.8 µmol/l) (nivel basal <1.0 mg/dl [<88.4 µmol/l]). El paciente fue hospitalizado y tratado con resucitación por fluidos y rasburicasa. El nivel de ácido úrico regresó al rango normal al cabo de 24 horas y el nivel de creatinina a los 3 días siguientes; el paciente fue dado de alta del hospital el día 4. El nivel de deshidrogenasa de lactato disminuyó gradualmente, normalizándose durante el siguiente mes.

Para el día 28 después de la infusión celular CART19, la adenopatía no siguió siendo palpable y el día 23, no hubo evidencia de CLL en médula ósea (Figura 12C). El cariotipo fue normal en este momento en 15 de las 15 células (46 XY) y el estudio FISH fue negativo para eliminación TP53 en 198 de las 200 células examinadas. Estos valores se consideran como formales dentro de los límites para controles negativos. El análisis de citometría de flujo no mostró ningún CLL residual y las células B no pudieron detectarse (<1% de células dentro del nivel

172

CD5+CD10-CD191+CD23+ división de linfocitos). El scan CT realizado el día 31 después de la infusión mostro una resolución de la adenopatía (Figura 12D).

Tres y luego 6 meses después de la infusión celular CART19, el examen físico continuo sin novedades y no hubo adenopatía palpable y el scan CT realizado 3 meses después de la infusión celular CART19 mostro una remisión sostenida (Figura 12D). Los estudios de medula ósea al cabo de 3 y 6 meses tampoco mostraron evidencia de CLL según los análisis morfológicos, los estudios de cariotipos (46 XY) o los análisis de citometria de flujo, con una carencia continuada de células normales B igualmente. La remisión se había sostenido por 10 meses como mínimo.

Toxicidad de células CART19

Las infusiones celulares no presentaron efecto de toxicidad aguda. El único evento adverso grave (grados 3 ó 4) registrados fue el síndrome de lisis tumoral grado 3 que se describió anteriormente. El paciente presento linfopenia de grado 1 en la base y linfopenia grados 2 ó 3 que empezaron el día 1 y continuaron hasta 10 meses como mínimo después de la terapia. La linfopenia grado 4 con un conteo absoluto de linfocitos de 140 células/mm³, se registro el día 19, sin embargo a partir del día 22 hasta por lo menos durante 10 meses, el conteo absoluto de linfocitos se ubico entre 390 y 780 células/mm³ (linfopenia grado 2 ó 3). El paciente presento trombocitopenia transitoria grado 1 (conteo plaquetario de

(73)

98.000 a 131.000 por milímetro cúbico) desde el día 19 hasta el día 26 y neutropenia grados 1 ó 2 (absoluto de neutrófilos, 1090 hasta 163/ mm^3) desde el día 17 hasta el día 33. Otros signos y síntomas que probablemente se relacionaron con el tratamiento de estudio incluyendo elevaciones de grados 1 y 2 en la aminotransferasa y niveles de fosfatasa alcalina, que se desarrollaron 17 días después de la primera infusión y se resolvieron el día 33, con síntomas constitucionales grados 1 y 2 consistentes en fiebres, escalofríos, diaforesis, mialgeas, cefaleas y fatiga. Se corrigió la hipogammaglobulinemia grado 2 con infusiones de globulina inmune intravenosa.

Análisis de Suero y Citoquinas de Medula Ósea

La respuesta clínica del paciente estuvo acompañada de un retardado incremento en los niveles de citoquinas inflamatorias (Figuras 13 hasta Figura 13D), con niveles de interferon- γ , quimoquinas interferon γ respondientes CXCL9 y CXCL10 e interleuquina 6 que fueron 160 veces más altas que los niveles basales. El aumento temporal de los niveles de citoquina en paralelo con los síntomas clínicos, llegaron a un pico de 17 a 23 días después de la primera infusión celular CART19.

Los sobrenadantes tomados después de los aspirados de medula ósea seriales se midieron para establecer evidencias de citoquinas dando pruebas de activación inmune (Figura 13E). El incremento significativo de interferon- γ , CXCL9,

174

interleuquina-6 y receptor interleuquina-2 soluble se registraron en comparación con los niveles basales del día anterior a la infusión de células T; y los valores adquirieron pico el día 23 después de la primera infusión celular CART19. El incremento en las citoquinas de medula ósea coincidió con la eliminación de células de leucemia a partir de la medula. No se registraron cambios en suero ni en el factor alfa de necrosis tumoral.

Expansión y Persistencia de Células T del Receptor de Antígeno Quimérico

El receptor (CAR19) de antígeno quimérico anti-CD19 que codifica el ADN fue detectado por el PCR en tiempo real a partir del día 1 después de la primera infusión (Figura 14 A). Se registro más de una expansión de 3 log de las células in vivo el día 21 después de la infusión. En los niveles pico, las células CART19 en sangre fueron responsables de más del 20% de linfocitos en circulación y estos niveles pico coincidieron con la ocurrencia de síntomas constitucionales, síndrome de lisis tumoral (Figura 12B) y elevaciones en niveles de citoquinas de suero (Figura 13 A hasta Figura 13D). Las células CART19 continuaron detectables a elevados niveles 6 meses después de las infusiones, aun cuando los valores se disminuyeron por un factor de 10 a partir de los niveles pico. El tiempo de duplicación de las células T del receptor de antígeno quimérico en sangre fue de aproximadamente 1.2 días, con eliminación de la vida media de 31 días.

Células T del Receptor de Antígeno Quimérico en Medula Ósea

175

Se identificaron las células CART19 en muestras de medula ósea a partir de 23 días contados después de la primera infusión (Figura 14B) y persistieron durante 6 meses como mínimo, con una afectación de la vida media de 34 días. Los niveles más elevados de células CART19 en medula ósea se identificaron en la primera evaluación 23 días después de la primera infusión y coincidieron con la inducción de una respuesta inmune, como lo señalan los perfiles de secreción de citoquina (Figura 13E). El análisis de citometría de flujo de los aspirados de medula ósea indicaron una expansión clonal de células CD5+CD19+ en la línea basal que estuvo ausente durante un mes después de la infusión y en una muestra obtenida 3 meses después de dicha infusión (no se suministran datos). Las células normales B no fueron detectadas después del tratamiento (Figura 14C).

Tratamiento con células CART19 modificadas genéticamente y autólogas

En esta sección se describe el desarrollo retardado del síndrome de lisis tumoral además de una respuesta completa tres semanas después del tratamiento con células T autólogas modificadas genéticamente para abordar el CD19 a través de la transducción con un vector lentivirus que expresa el anti-CD19 unido al CD3-zeta y a los dominios de señalización CD137 (4-1BB). Las células genéticamente modificadas estuvieron presentes a elevados niveles en medula ósea durante 6 meses como mínimo después de la infusión. La generación de una respuesta

176

inmune específica para CD19 en médula ósea se pudo demostrar mediante la liberación temporal de citoquinas y ablación de células de leucemia que coincidieron con el infiltrado pico de las células T receptoras del antígeno quimérico. El desarrollo del síndrome de lisis tumoral después de la inmunoterapia celular no se reportó previamente (Baeksgaard et al., 2003, *Cáncer Chemother Pharmacol*, 51:187-92).

La manipulación genética de las células T autólogas para abordar antígenos tumorales específicos es una estrategia atractiva para la terapia del cáncer (Sadelain et al., 2009, *Curr Opin Immunol*, 21:215-23; Jena et al., 2010, *Blood*, 116: 1035-44). Una característica importante del enfoque aquí descrito es que las células T receptoras del antígeno quimérico pueden reconocer blancos tumorales de una manera sin restricciones HLA, de tal manera que los receptores antígenos quiméricos "bajados del estante" pueden construirse para tumores que tengan una amplia gama de características histológicas. Los vectores lentivirales derivados del VIH se utilizaron para terapia de cáncer, un enfoque que puede presentar ciertas ventajas con respecto del uso de vectores retrovirales (Jume et al., 2009, *Nat Rev Immunol*, 9: 704-16).

En estudios previos de células T del receptor de antígeno quimérico, las respuestas tumorales objetivas han sido modestas, y la proliferación in vivo de células modificadas no se ha podido sostener (Kershaw et al., 2006, *Clin Cancer Res*, 12: 6106-15; Till et al., 2008, *Blood*, 112: 2261-71; Pule et al., 2008, *Nat Med*,

177

14: 1264-70) Brenthens y colgeas reportaron resultados preliminares de un ensayo clínico de receptores de antígeno quimérico abordados por CD19 vinculados a un dominio de señalización CD28 y pudieron encontrar respuestas de tumor transitorio en dos de los tres pacientes con CLL avanzado (Brenthens et al., 2010, Mol Ther, 18: 666-8); sin embargo, los receptores de antígeno quimérico desaparecieron rápidamente de la circulación.

Fue inesperado que la dosis muy baja de células E del receptor antigénico quimérico se infundieran y pudieran dar como resultado una respuesta antitumoral evidente desde el punto de vista clínico. En realidad, la dosis infundida de 1.5×10^5 de células T del receptor antigénico quimérico por kilogramo estuvo en varias órdenes de magnitud por debajo de las dosis utilizadas en estudios previos de células T modificadas para expresar receptores de antígeno quimérico o receptores de las células T transgénicas (Kershaw et al., 2006, Clin Cancer Res, 12: 6106-15; Brentjens et al., 2010, Mol Ther, 18: 666-8; Morgan et al., 2010, Mol Ther, 18: 843-51; Johnson et al., 2009, Blood, 114: 535-46). Sin acogerse a una teoría en particular, se especula que la quimioterapia puede potenciar los efectos del receptor de antígeno quimérico.

La persistencia prolongada de células CART19 en sangre y médula ósea del paciente es el resultado de la inclusión del dominio de señalización 4-1BB. Es probable que la eliminación de células normales B mediadas por las células CART19 facilitara la inducción de tolerancia inmunológica al receptor de antígeno

170

quimérico, puesto que las células CART19 que expresan el fragmento de anticuerpos Fv de una sola cadena que contiene secuencias de murine no se hubiesen rechazado. Dada la ausencia de células de leucemia positiva CD19 detectables para este paciente y sin acogerse a una teoría en particular, es posible que se alcanzara la homeostasis de las células T del receptor de antígenos quiméricos por lo menos en parte a partir de la estimulación proporcionada por progenitores iniciales de célula B en la medida en que estos hubiesen empezado a emerger en la médula ósea. El invento se relaciona con el descubrimiento de que puede existir un nuevo mecanismo para mantener las células T receptoras del antígeno quimérico de "memoria".

Aun cuando el CD19 es un blanco tumoral atractivo, con expresión limitada a las células normales y malignas B, existe preocupación por la persistencia de las células T receptoras del antígeno quimérico que pueden mediar la deficiencia de células B a largo término. En efecto, en el paciente, las células B estuvieron ausentes de la sangre y de la médula ósea como 6 meses como mínimo después de la infusión. Este paciente no presentó infecciones recurrentes. Las células blanco B a través del CD20 con rituximab constituyen una estrategia eficaz y relativamente segura para pacientes con neoplasmas de células B, y es manejable por lo tanto la linfopenia de células B a largo término (Molina, 2008, Ann rev Med, 59: 237-50). Los pacientes tratados con rituximab tienen de acuerdo con los informes un retorno de células B dentro de los meses siguientes a la suspensión

179

de la terapia. No es todavía claro si dicha recuperación ocurre en pacientes cuyas células T anti-células T persistan in vivo.

Los pacientes que tienen CLL con eliminaciones TP53 presentan cortas remisiones después de terapias estándar (Dohner et al., 1995, *Blod* 85: 1580-9). Los trasplantes alogénicos de médula ósea han sido el único enfoque que hubiese inducido remisiones de largo término en pacientes con CLL avanzado (Gribben et al., 2011, *Biol Blood Marrow Transplant*, 17: Suppl:S63-S70). Sin embargo, el efecto potente resultante de injerto –versus-tumor se asocia con una considerable morbilidad debido a la elevada frecuencia de enfermedad crónica de injerto-versus*huésped, que frecuentemente es severa en pacientes mayores, quienes se afectan típicamente por el CLL (Gribben et al., 2011, *Biol Blood Marrow transplant*, 17: Suppl: S63-S70; Sorror et al., 2008, *Blood*, 111: 446-52). Los datos que aquí se presentan sugieren que las células T autólogas y genéticamente modificadas pueden contrarrestar esta limitación.

La aparición retardada del síndrome de lisis tumoral y la secreción de citoquinas combinadas con expansión de células T del receptor antígeno quimérico in vivo en forma vigorosa y la actividad anti-leucemia prominente, señala hacia funciones del efector sustancial y sostenido de las células CART19. Los experimentos descritos aquí resaltan la potencia de esta terapia y brindan un soporte para el estudio detallado de las células autólogas T modificadas genéticamente para abordar el CD19 (y otros blancos) mediante la transducción de un receptor antígeno

quimérico unido a dominios potentes de señalización. A diferencia de la terapia mediada por anticuerpos, las células T modificadas por receptores de antígenos quiméricos tienen el potencial de replicarse in vivo, y la persistencia a largo término podría conducir a un control sostenido de tumores. Otros dos pacientes con CLL avanzado también han recibido infusiones CART19 de acuerdo con el presente protocolo, y todos los tres han tenido respuestas tumorales. Estos hallazgos ameritan un estudio continuado de células T re-direccionadas CD19 para los neoplasmas celulares B.

Las revelaciones de todas y cada una de las patentes, solicitudes de patente y publicaciones citadas en este documento se incorporan al mismo por referencia en cuanto a su totalidad. Si bien este invento ha sido revelado con referencia a presentaciones específicas, es obvio que otras presentaciones y variaciones de este invento pueden elaborarse por parte de otras personas expertas en la materia sin apartarse del verdadero espíritu y alcance del invento. Las reivindicaciones que se anexan tienen por objeto incluir todas estas presentaciones y variaciones equivalentes, por lo tanto deben interpretarse en este sentido.

REIVINDICACIONES

Las reivindicaciones del presente invento son las siguientes:

181

1. Una secuencia del ácido nucleico aislado que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), donde el CAR comprende un dominio de unión de antígeno, un dominio de transmembrana, una región de señalización co-estimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta, donde este dominio de señalización CD3 zeta comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.: 24.
2. La secuencia del ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, donde el CAR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 12.
3. La secuencia del ácido nucleico aislado de la reivindicación 1 que comprende la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID No: 8.
4. La secuencia del ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, donde el dominio de unión del antígeno es un anticuerpo o bien uno de sus fragmentos de unión con el antígeno.
5. La secuencia del ácido nucleico aislado de la reivindicación 4, donde el fragmento de unión con el antígeno es un Fab o un scFv.
6. La secuencia del ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, donde el dominio de unión con el antígeno se une a un antígeno tumoral.

102

7. La secuencia del ácido nucleico aislado de la reivindicación 6, donde el antígeno tumoral se asocia con una condición hematológicamente maligna.
8. La secuencia del ácido nucleico aislado de la reivindicación 6, donde el antígeno tumoral se asocia con un tumor sólido.
9. La secuencia del ácido nucleico aislado de la reivindicación 6, donde el antígeno tumoral se selecciona a partir del grupo conformado por CD19, CD20, CD22, RORI, mesotelin, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, Glicolípido F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR, y cualquiera de sus combinaciones.
10. La secuencia del ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, donde la región de señalización co-estimuladora comprende el dominio intracelular de una molécula co-estimuladora seleccionada a partir del grupo conformado por CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno – 1 asociado con la función linfocítica (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 un ligando que se une específicamente con CD83 y cualquiera de sus combinaciones.
11. La secuencia del ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, donde el dominio de señalización CD3 zeta se codifica por parte de la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID No. 18.

12. Un receptor de antígeno quimérico aislado (CAR) que comprende un dominio de unión de antígeno, un dominio de transmembrana, una región de señalización co-estimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta, donde el dominio de señalización CD3 zeta comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 24.
13. El CAR aislado de la reivindicación 12, donde dicho CAR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 12
14. El CAR aislado de la reivindicación 12, donde el dominio de unión con el antígeno es un anticuerpo o uno de sus fragmentos de unión con el antígeno.
15. El CAR aislado de la reivindicación 14, donde el fragmento de unión con el antígeno es un Fab o un scFv.
16. El CAR aislado de la reivindicación 12, donde el dominio de unión con el antígeno se une a un antígeno tumoral.
17. El CAR aislado de la reivindicación 16, donde el antígeno tumoral se asocia con una malignancia hematológica.

1091

18. El CAR aislado de la reivindicación 16, donde el antígeno tumoral se asocia con un tumor solido.
19. El CAR aislado de la reivindicación 16, donde el antígeno tumoral se selecciona a partir del grupo conformado por CD19, CD20, CD22, RORI, mesotelin, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, Glicolipido F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR, y cualquiera de sus combinaciones.
20. El CAR aislado de la reivindicación 12, donde la región de señalización co-estimuladora comprende el dominio intracelular de una molécula co-estimuladora seleccionada a partir del grupo conformado por CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno – 1 asociado con la función linfocítica (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 un ligando que se une específicamente con CD83 y cualquiera de sus combinaciones.
21. Una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), donde el CAR comprende un dominio de unión con el antígeno, un dominio de transmembrana, una región de señalización co-estimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 24.
22. La célula de la reivindicación 21, donde el CAR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 12.

105

23. La célula de la reivindicación 21, donde el ácido nucleico comprende la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID No. 8.
24. La célula de la reivindicación 21, donde el dominio de unión con el antígeno es un anticuerpo o bien uno de los fragmentos de unión con el antígeno.
25. La célula de la reivindicación 24, donde el fragmento de unión con el antígeno es un Fab o un scFv.
26. La célula de la reivindicación 21, donde el dominio de unión con el antígeno se une a un antígeno tumoral.
27. La célula de la reivindicación 26, donde el antígeno tumoral se asocia con una malignancia hematológica.
28. La célula de la reivindicación 26, donde el antígeno tumoral se asocia con un tumor sólido.
29. La célula de la reivindicación 26, donde el antígeno tumoral se selecciona a partir del grupo conformado por CD19, CD20, CD22, RORI, mesotelin, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, Glicolipido F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR, y cualquiera de sus combinaciones.

30. La célula de la reivindicación 21, donde la región de señalización co-estimuladora comprende el dominio intracelular de una molécula co-estimuladora seleccionada a partir del grupo conformado por CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno – 1 asociado con la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 un ligando que se une específicamente con CD83 y cualquiera de sus combinaciones.
31. La célula de la reivindicación 21, donde el dominio de señalización CD3 zeta se codifica por medio de la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID No: 18.
32. La célula de la reivindicación 21, donde la misma se selecciona a partir del grupo conformado por una célula T, una célula Eliminadora Natural (NK), un linfocito T citotóxico (CTL) y una célula T regulatoria.
33. La célula de la reivindicación 21, donde esta exhibe una inmunidad antitumoral cuando el dominio de unión con el antígeno se une a su correspondiente antígeno.
34. Un vector que comprende una secuencia del ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), donde el CAR comprende un dominio de unión con el antígeno, una región de señalización co-estimuladora y un

dominio de señalización CD3 zeta, donde el dominio de señalización CD3 zeta comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 24.

35. El vector de la reivindicación 34, donde el CAR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 12.
36. El vector de la reivindicación 34, donde la secuencia del ácido nucleico aislado que codifica un CAR comprende la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID No. 8.
37. El vector de la reivindicación 34, donde el dominio de unión con el antígeno es un anticuerpo o uno de los fragmentos de unión con el antígeno.
38. El vector de la reivindicación 37, donde el fragmento de unión con el antígeno es un Fab o un scFv.
39. El vector de la reivindicación 34, donde el dominio de unión con el antígeno se une a un antígeno tumoral.
40. El vector de la reivindicación 39, donde el antígeno tumoral se asocia con una malignancia hematológica.

41. El vector de la reivindicación 39, donde el antígeno tumoral se asocia con un tumor solido.
42. El vector de la reivindicación 39, donde el antígeno tumoral se selecciona a partir del grupo conformado por CD19, CD20, CD22, RORI, mesotelin, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, Glicolipido F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR, y cualquiera de sus combinaciones.
43. El vector de la reivindicación 34, donde la región de señalización co-estimuladora comprende el dominio intracelular de una molécula co-estimuladora seleccionada a partir del grupo conformado por CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno – 1 asociado con la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 un ligando que se une específicamente con CD83 y cualquiera de sus combinaciones
44. El vector de la reivindicación 34, donde el dominio de señalización CD3 zeta se codifica por medio de la secuencia del acido nucléico de SEQ ID No. 18
45. Un método para estimular una respuesta inmune mediada por células T a una población de células blanco o tejidos en un mamífero, donde el método comprende la administración a un mamífero de una cantidad eficaz de una célula genéticamente modificada para expresar un CAR donde este ultimo comprende un dominio de unión con el antígeno, una región de señalización

co-estimuladora y un dominio de señalización CD3-zeta que comprende la secuencia del aminoácido de SEQ ID No: 24, donde el dominio de unión con el antígeno se selecciona para reconocer específicamente una población celular blanco o el tejido.

46. Un método para proporcionar inmunidad antitumoral en un mamífero, donde este método comprende la administración al mamífero de una cantidad eficaz de una célula genéticamente modificada para expresar un CAR donde este ultimo comprende un dominio de unión con el antígeno, una región de señalización co-estimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.:24, proporcionando de esta manera una inmunidad antitumoral en el mamífero.
47. Un método para el tratamiento de un mamífero que tenga una enfermedad, trastorno o condición que se asocie con una expresión elevada de un antígeno tumoral, donde este método comprende la administración al mamífero de una cantidad eficaz de una célula genéticamente modificada para expresar un CAR, donde este ultimo comprende un dominio de unión con el antígeno, una región de señalización co-estimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.; 24, tratando de esta manera al mamífero.
48. El método de la reivindicación 47, donde la célula es del tipo autologa T.

100

49. El método de la reivindicación 47, donde el antígeno tumoral se selecciona a partir del grupo conformado por CD19, CD20, CD22, RORI, mesotelin, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, Glicolipido F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR, y cualquiera de sus combinaciones.
50. Un método para el tratamiento de un humano que tenga leucemia linfocítica crónica, donde dicho método comprende la administración al humano de una célula T modificada genéticamente para expresar un CAR, donde este ultimo comprende un dominio de unión con el antígeno, una región de señalización co-estimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.: 24.
51. El método de la reivindicación 50, donde el humano es resistente por lo menos a un agente quimioterapéutico.
52. El método de la reivindicación 50, donde la leucemia linfocítica crónica es una leucemia refractaria CD19+ y linfoma.
53. Un método para generar una población persistente de células T modificadas genéticamente en un humano al cual se le diagnostico cáncer, donde este método comprende la administración al humano de una célula T genéticamente modificada para expresar un CAR, donde dicho CAR

(a)

comprende un dominio de unión con el antígeno, una región de señalización co-estimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 24, donde la población persistente de células T modificadas genéticamente persiste en el humano durante un mes como mínimo después de la administración.

54. El método de la reivindicación 53, donde la población persistente de células T modificadas genéticamente comprende como mínimo una célula seleccionada a partir del grupo conformado por una célula T que se le administra al humano, una progenie de células T que se administra al humano y una combinación de las mismas.
55. El método de la reivindicación 53, donde la población persistente de células T modificadas genéticamente comprende una célula T de memoria.
56. El método de la reivindicación 53, donde el cáncer es una leucemia linfocítica crónica.
57. El método de la reivindicación 56, donde la leucemia linfocítica crónica es del tipo leucemia refractaria CD19+ y linfoma.

192

58. El método de la reivindicación 53, donde la población persistente de células T modificadas genéticamente persiste en el humano durante 3 meses como mínimo después de la administración.
59. El método de la reivindicación 53, donde la población persistente de células T modificadas genéticamente persiste en el humano durante 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, dos años o tres años como mínimo después de la administración.
60. El método de la reivindicación 56, donde se trata la leucemia linfocítica crónica.
61. Un método para expandir una población de células T genéticamente modificadas en un humano diagnosticado con cáncer, donde el método comprende la administración al humano de una célula T modificada genéticamente para expresar un CAR donde este último comprende un dominio de unión con el antígeno, una región de señalización co-estimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 24, donde la célula T genéticamente modificada que se administra produce una población de células T de progenie en el humano.

62. El método de la reivindicación 61, donde las células T de progenie en el humano comprenden una célula T de memoria.
63. El método de la reivindicación 61, donde la célula T es de tipo autóloga T,
64. El método de la reivindicación 61, donde el humano es resistente por lo menos a un agente quimioterapéutico.
65. El método de la reivindicación 61, donde el cáncer es leucemia linfocítica crónica.
66. El método de la reivindicación 65, donde la leucemia linfocítica crónica es del tipo leucemia refractaria CD19+ y linfoma
67. El método de la reivindicación 61, donde la población de células de progenie T persiste en el humano durante tres meses como mínimo después de la administración
68. El método de la reivindicación 61, donde la población de células progenie T persiste en el humano durante un tiempo de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, meses o 2 años o 3 después de la administración.
69. El método de la reivindicación 61, donde se trata el cáncer.

FIGURA 1 A

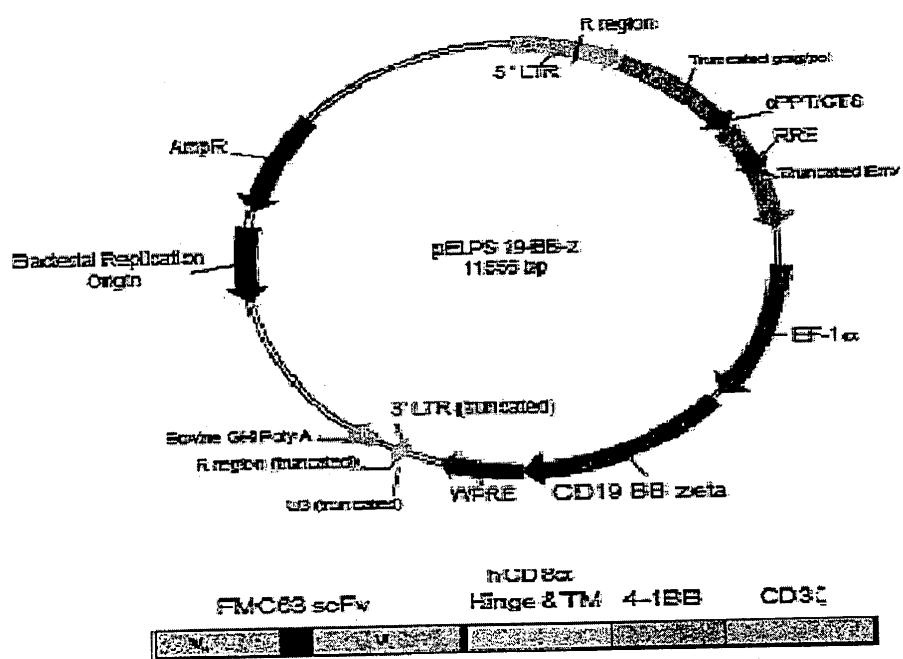


Figure 1A

10/2

FIGURA 1 B

	Día 0	Día 0-1	Día 3	Día 5	Día de cultivo (10 ± 2)
Leucocito Aferesis 	Selección positiva CD3/28 de células T con anti-CD3/ anti- CD28 mAb con esferas magnéticas recubiertas 	Semilla en bolsas permeables al gas. Transducción con vector w/ αCD19- 41BBζ 	Lavado de vector. Cultivo en bolsas permeables al gas 	Cultivo en Bioreactor de onda 	Remoción de esferas  Cultivo, lavado, Concentrado  Crioconservacion del producto final en criomedios infusibles

18

FIGURA 1 C

Células Malignas B CD19+

1. FDA Approve Therapy = Terapia aprobada por la FDA
2. Monitor for recurrence = Monitor para recurrencia
3. Relapse = Recaida
4. Eligibility Tumor Restaging = Elegibilidad de Reabordaje Tumoral
5. PBMC Baseline Assays = Estudios basales PBMC
6. Manufacture /Cryopreservation = Elaboracion /Crioconservacion
7. Apheresis = Aferesis
8. Assess Response = Evaluación de Respuesta
9. PBMC Marrow Endpoint Assays =PBMC Estudios de punto final de medula
10. T Cell Infusion = Infusión de células T
11. Day 0, 1, 2 =Días 0, 1, 2
12. Day 10 – 14 Full Dose if available = Día 10 – 14 Dosis total si está disponible
13. Monthly observation / monitoring 6 months post infusión =Observacion mensual / monitoreo 6 meses post-infusion.
14. Quarlerly observation/monitoring To year 2 = observación trimestral/ monitoreo hasta 2 años.
15. Roll over to destination protocol for 15 year f/u for monitoring for delayed AEs related to gene transfer = Análisis hasta lograr el protocolo de destino por

espacio de 15 años f/u para monitoreo por AEs retardados en relación con la transferencia de genes.

FIGURA 2 A – 2B

1. UPN 01 Blood = Sangre UPN 01
2. Day (post infusión) = Día (post – infusión)
3. UPN 02 Blood = Sangre UPN 02
4. Day (post infusión) = Día (post – infusión)

FIGURA 2C – SD

1. UPN 01 Marrow = Medula ósea UPN 01

FIGURA 3C -3D

1. Serun Cytokine (fold change from baseline) = Suero citoquina (cambios a partir del nivel basal)

FIGURA 5 A

1. Corticosteroids started = iniciar con corticosteroides
2. Days from infusión = Días a partir de la infusión

FIGURA 6

1. Total Cells in circulation = Total de células en circulación
2. Day (post infusión) = Día post infusión

FIGURA 10

Sujeto o UPN	Edad/Sexo Cariotipo	Terapias previas	Carga Tumoral CLL en línea basal			Dosis total de CART19 (células/kg)	Respuesta a D+30 (Duración)
			Medula ósea (día de estudio)	Sangre (día de estudio)	Nodos /bazo (día de estudio)		
01	65/M Normal	Fludarabine x 4 ciclos (2002) Rituximab bludarabina x 4 ciclos (2005) Alemtuzumab x 12 semanas (2006) Rituximab (2 series 2008- 2009) R-CVP x 2 ciclos (5/18- 6/18/2010) Bendamistina x 1 ciclo (7/31-8/1/10)pre-CART19	Hipercelular r 70% CLL Células 24 x 10 ² CLL (día 14) Células 1.7 x 10 ² CLL (día 1)	N/A	Células 6.2x10 ¹¹ – 1.0 x 10 ¹² CLL (día 37)	1.1 x 10 ⁹ 1.2 (1.5 x 10 ⁷ / kg)	CR (8 meses)
02	77/M De(17Xp13) ¹	Alemtuzumab x 16 semanas (6/2007) Alemtuzumab x 18 eses	Hipercelular r >95% CLL células	Células 2.75 x 10 ¹¹	Células 1.2x 10 ¹² –	5.8 x 10 ⁸ (1.0 x 10 ⁷ /kd)	PR (5 meses)

100

		(32009) Bendamustina/ Rituximab: 7/1/2010 (1ciclo) 17/28/2012 (2ciclos) 8/26/2010 (3ciclos) Pre-CART19	3.2x10 ¹² CLL (día 47)	CLL (día 1)	2.0 x 10 ¹² (día 24)		
03	64/M Del(17Xp13) 2	R-Fludarabine x 2 ciclos (2002) R-Fludarabine x 4 ciclos (10.06-1/07) R- Bendamustina X1 CICLO (2/09) Bendamustina x 3 ciclos (3.5/09) Alentzumab x 11 semanas (1209-3/10) Pentastatin/ciclofosfamid a 7/10/10) pre-CART19	Hipercelula r 40% CLL Células 8.8x10 ¹¹ CLL (Día 1)	N/A	Células 3.3 x 10 ¹¹ – 5.5 x 10 ¹¹ CLL (día 10)	1.4x 10 ⁷ (1.45 x 10 ⁶ /kg)	CR (7 meses)

- 1. UPN 02 Cariotipo (Nomenclatura ISCN): 45.XY del...
- 2. UPN 03 Cariotipo (nomenclatura ISCN): ...

Ver materiales complementarios para conocer los métodos para la determinación de carga tumoral.

100

200

FIGURA 11
PROCESO DE ELABORACION CART-19

	Aferesis linfocitica	
Día 0		Muestras: Esterilidad Conteo /viabilidad
	Elutriacion (Draft SOP 0211)	
	Lavado citomato (SOP 0290)	
Día 1		Muestras: Pre-expansión/Pre-TND pellet
	Transducción (SOP 0262) CD19.41BB	
	Cultivo en frascos	
Día 3 - 4	Lavado de Vector (SOP 0290) Cultivo en frascos Lifecell (SOP 0221)	
Día 5 - 11		Citometria de flujo D7
	Cultivo en Birreactor de onda (SOP 0660. C661. 0665)	Muestras pre H: Conteo/ movilidad Citometria de flujo Pellet (vector secuencia ADN, cuantitativo V8V- o ADN) Células de crio-conservación (CRL)
Día de Recolección	Retirar esfera. Max Sep (SOP 0264)	
	Recolección Fenwal (SOP 0263)	
		Recolección Harvest (RCL)
	Producto post-Recolección	
		Muestras post H Conteo /viabilidad Post-H Supe (BSA ELISA) Numero de esferas residuales
	Crio conservación para el producto final en criomedios de infusión (SOP 0271,	

201

	0272, 0717)	
		Muestras de formulación final Cultivo de bacterias /hongos Endotoxinas Vials centinelas

FIGURA 12 A – 12B

- 1. Creatinina en suero B, Acido Úrico y LHD
- 2. A Lentiviral vector = Vector Lentiviral A
- 3. Bacterial replication origin = origen de replicación de bacterias
- 4. Bovine GH Poly A = Bovino GH
- 5. R region (truncated) = Región R (truncada)
- 6. Human CD8α = Humano CD8α Unió y TM 4-1BB
- 7. R región = Región R
- 8. Truncated gag/pol = gag/pol truncado

202

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL	Solicitud Internacional No. PCT/US1164191
A. CLASIFICACION DE TEMAS IPC(8) – CO7H 21/04; AB1K 39/00 (2012.01) USPC – 536/23.1; 424/134.1 De acuerdo con la clasificación Internacional de patentes (IPC) o según la clasificación Nacional e IPC.	
B. CAMPOS INVESTIGADOS	
Documentación mínima investigada (sistemas de clasificación aplicados por símbolos de clasificación) USPC 536/23.4, 424/134.1	
Documentación investigada distinta de la documentación mínima en la medida en que dichos documentos se incluyen en el campo investigado USPC 424/155.1; 424/143.1; 424/135.1; 435/235.1; 435/320.1; 435/328; 435/344.1; 435/372; 435/372.3; 435/68.5; 435/69.7; 530/387.3; 530/388.22; 530/388.85; 536/23.53; 536/23.5; 424/93.21; 530/350.	
Base electrónica de datos consultada durante la búsqueda internacional (nombre de base de datos y en lo pertinente términos utilizados para la búsqueda) PubWEST(PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB), Google Patents; Google School: Chimeric T cell receptor, Chimeric antigen receptor. Human CD3 zeta chain dominio intracelular, CD3 zeta, signoling. TCRZ: CD3-ZETA. CD247, CD247 antigen, CD37, R1R3 complex TCR2013. Conservative substitution Gen Core 8.3 SEQ ID No. 24, 12, 8	

203

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS COMO RELEVANTES		
CATEGORIA	Cita de documentos, con indicación en lo relacionado con las secciones pertinentes	Relevante para la reivindicación No.
A	WO 2010/025177 A1(Jonson) de Marzo 2010 (04.03.2010) Atrack Fig.1 (ESTA PARTE ES IGUAL AL TEXTO ORIGINAL)	1 - 69
X Documentos adicionales listados en la continuación de la casilla C.		
* Categorías especiales de documentos citados: "A" Documento que define el estado general de la técnica que no se considera como de relevancia en particular. "E" Aplicaciones anteriores o patentes publicadas en o después de la fecha de radicación internacional. "L" Documento que puede arrojar dudas sobre las reivindicaciones prioritarias o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otro motivo especial (según especificación). "O" Documento que se refiere a una revelación oral, uso , exhibición u otro propósito. "P" Documento publicado antes de la fecha de radicación internacional pero con		

posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" Documento posterior publicado después de la fecha de radicación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o teoría que subyace al invento.

"X" Documento de relevancia en particular, donde el invento reivindicado no puede considerarse como novedoso o no puede considerarse como implicación de un paso inventivo si el documento se toma en forma aislada.

"Y" Documento de relevancia en particular, donde el invento reivindicado no puede considerarse como documento que implique un paso inventivo si el documento se combina con uno o más de dichos documentos y esta combinación es obvia para una persona conocedora de la materia.

"&" Documento que hace parte de la misma serie de patente.

Fecha de finalización de la búsqueda internacional: 08 de Abril de 2012

Fecha de envío por correo del informe de búsqueda internacional: 01 de Mayo de 2012

Nombre y dirección de correo del ISA/US:

Mail Stop PCT, Atn. ISA/USA
Commissioner for Patents P.O. Box.
1450, Alexandria, Virginia, 22313-1450

Fax: No. 571-273-3201

Funcionario Autorizado: Lee W. Young
PCT

DOCUMENTO CONSIDERADO RELEVANTE

205

Solicitud Internacional o. **PCT/US 11/64191**

Nucleótidos y/o secuencias de aminoácidos (Continuación del ítem 1 c. de la primera hoja)

1. Con respecto de nucleótidos y/o secuencias de aminoácidos que se revelan en la solicitud internacional, la búsqueda internacional se llevo a cabo con base en una secuencia que hace un listado de radicaciones.
 - a. (Medio)
☒ en formato electrónico
 - b. (tiempo)
☒ junto con la solicitud internacional en formato electrónico
2. Adicionalmente, en el caso que más de una versión o copia de listado de secuencia se hubiese radicado o suministrado, las declaraciones requeridas en el sentido que la información de las copias subsiguientes o adicionales sea idéntica a la de la solicitud que se presento o no sobrepasa la solicitud que se radico, en lo pertinente, es información suministrada.
3. Comentarios adicionales
GenCore 6.3: SEQ ID No. 24, 12, 8.

Vop

Presentación Electrónica

OFICINA INTERNACIONAL DE LA ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL

DE PROPIEDAD INTELECTUAL SEGÚN EL TRATADO

DE COOPERACION DE PATENTES

Solicitante: THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

(DIRECTIVOS DE LA UNIVERSIDAD DE PENSILVANIA)

(Todos los Estados designados excepto los Estados Unidos de América)

JUNE, Carl H., LEVINE, Bruce L., KALOS, Michael D., y PORTER David L.

(Estados Unidos de América solamente)

Fecha de Radicación Internacional: 09 Diciembre 2011 (09.12.2011)

Fechas de Prioridad Reivindicadas: 09 Diciembre 2010 (09.12.2010)

Solicitud Internacional No.: PCT/US2011/64191

Referencia de Radicación de Solicitante: 046483-6001-00-WO.601218

Título: USO DE CELULAS T MODIFICADAS POR RECEPTOR DE ANTIGENO QUIMERICO PARA TRATAMIENTO DEL CANCER

MODIFICACIONES DE ACUERDO CON EL ARTICULO 19

The International Bureau of WIPO

34 Chemin des Colombettes

1211 Geneva 20

Switzerland

Apreciados Señores:

De acuerdo con lo establecido en el Artículo 19 de las Regulaciones del PCT, sírvanse modificar la solicitud de patente de la referencia sin que esto ocasione perjuicios. La modificación se radica oportunamente, en vista de que el Informe Internacional de Búsqueda Correspondiente a la solicitud de patente de la referencia se expidió en Mayo 1 de 2012, en donde se establece el plazo de Julio 2 de 2012 (Julio 1, 2012 cae en día Domingo).

No se causan derechos por la radicación de este documento. Si hay necesidad de pagar algunos derechos, favor hacer el cobro respectivo y hacer la nota crédito por sobre costos a la Cuenta No. 50-5366.

1038381

PCT/US2011/64191 (Expediente No.46483-6001-00-wo601218)

Modificación según el Artículo 19.

Reivindicaciones Modificadas

Las siguientes reivindicaciones operacionales operan para el presente acto:

1. (original) Una secuencia aislada del ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), donde dicho CAR comprende un dominio de unión de antígeno, un dominio de transmembrana, una región de señalización costimuladora y un dominio de señalización de CD3 zeta, en donde dicho dominio de señalización CD3 zeta comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 24.
2. (original) La secuencia aislada del ácido nucleico de la reivindicación 1, donde el CAR comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID No: 12.
3. (original) La Secuencia aislada del ácido nucleico de la reivindicación 1, que comprende la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID No: 12.
4. (original) La secuencia aislada del ácido nucleico de la reivindicación 1, donde el dominio de unión del antígeno es un anticuerpo o un fragmento de unión del antígeno del mismo.
5. (original) La secuencia aislada del ácido nucleico de la reivindicación 4, donde el fragmento de unión con el antígeno es un Fab o un scFv.
6. (original) La secuencia aislada del ácido nucleico de la reivindicación 1, donde el dominio de unión del antígeno se une a un antígeno tumoral.

- 20 @
7. (original) La secuencia aislada del acido nucleico de la reivindicación 6, donde el antígeno tumoral se asocia con un evento maligno hematológico.
 8. (original) La secuencia aislada del acido nucleico de la reivindicación 6, donde el antígeno tumoral se asocia con un tumor solido.
 9. (original) La secuencia aislada del acido nucleico de la reivindicación 6, donde el antígeno tumoral se selecciona a partir del grupo conformado por CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelin, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, Glicolipidos F77, EGFR VIII, GD-2, NY-ESO-1TCR, MAGE A3 TCR, y cualquiera de sus combinaciones.
 10. (original) La secuencia aislada del acido nucleico de la reivindicación 1, donde la región de señalización costimuladora comprende el dominio intracelular de una molécula costimuladora seleccionada a partir del grupo conformado por CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno asociado a la función linfocítica -1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente al CD83, y cualquiera de sus combinaciones.
 11. (original) La secuencia aislada del acido nucleico de la reivindicación 1, donde el dominio de señalización CD3 zeta se codifica mediante la secuencia del acido nucleico del SEQ ID No: 18.

12. (original) Un receptor aislado del antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión de antígeno, un dominio de transmembrana, una región de señalización costimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta, donde el dominio de señalización CD3 zeta comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 24.
13. (original) El CAR aislado de la reivindicación 12, donde dicho CAR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 12.
14. (original) El CAR aislado de la reivindicación 12, donde el dominio de unión del antígeno es un anticuerpo o uno de los fragmentos de unión del antígeno.
15. (original) El CAR aislado de la reivindicación 14, donde el fragmento de unión del antígeno es un Fab o un scFv.
16. (original) El CAR aislado de la reivindicación 12, donde el dominio de unión del antígeno se une a un antígeno tumoral.
17. (original) El CAR aislado de la reivindicación 16, donde el antígeno tumoral se asocia con una condición hematológica maligna.

22

18. (original) El CAR aislado de la reivindicación 16, donde el antígeno tumoral se asocia con un tumor solido.

19. (original) El CAR aislado de la reivindicación 16, donde el antígeno tumoral se selecciona a partir del grupo conformado por CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelin, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, Glicolipido F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR y cualquiera de sus combinaciones.

20. (original) El CAR aislado de la reivindicación 12, donde la región de señalización costimuladora comprende el dominio intracelular de una molécula costimuladora seleccionada a partir del grupo conformado por CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno -1 asociado a la función linfocítica (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, KG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente al CD83, y cualquiera de sus combinaciones.

21. (original) Una célula que comprende una secuencia del ácido nucleico que codifica un receptor antígeno quimérico (CAR), donde dicho CAR comprende un dominio de unión de antígeno, un dominio de transmembrana, una región de señalización costimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 24.

22. (original) La célula de la reivindicación 21, donde el CAR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 12.

212

23. (original) La célula de la reivindicación 21, donde el ácido nucleico comprende la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID No: 8

24. (original) La célula de la reivindicación 21, donde el dominio de unión del antígeno es un anticuerpo o un fragmento de unión con el antígeno.

25. (original) La célula de la reivindicación 24, donde el fragmento de unión con el antígeno es un Fab o un scFv.

26. (original) La célula de la reivindicación 21, donde el dominio de unión del antígeno se une a un antígeno tumoral.

27. (original) La célula de la reivindicación 26, donde el antígeno tumoral se asocia con una condición hematológicamente maligna.

28. (original) La célula de la reivindicación 26, donde el antígeno tumoral se asocia con un tumor sólido.

29. (original) La célula de la reivindicación 26, donde el antígeno tumoral se selecciona a partir del grupo conformado por CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelin, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, Glicolípido F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR y cualquiera de sus combinaciones.

30. (original) La célula de la reivindicación 21, donde la región de la señalización costimuladora comprende el dominio intracelular de una molécula costimuladora seleccionada a partir del grupo conformado por CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno -1 asociado a la función linfocítica (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, KG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente al CD83, y cualquiera de sus combinaciones.
31. (original) La célula de la reivindicación 21, donde el dominio de señalización CD3 zeta se codifica mediante la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID NO: 18.
32. (original) La célula de la reivindicación 21, donde la misma se selecciona a partir del grupo conformado por una célula T, una célula Eliminadora Natural (NK), un linfocito cito-tóxico T (CTL) y una célula reguladora T.
33. (original) La célula de la reivindicación 21, donde la misma muestra una inmunidad anti-tumoral cuando el dominio de unión del antígeno se une a su antígeno correspondiente.
34. (original) Un vector que comprende una secuencia del ácido nucleico que codifica un receptor antígeno quimérico (CAR), donde el CAR comprende un dominio de unión de antígeno, una región de señalización costimuladora, y

un dominio de señalización CD3 zeta, en donde el dominio de señalización CD3 zeta comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 24.

35. (original) El vector de la reivindicación 34, donde el mismo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 12.

36. (original) El vector de la reivindicación 34, donde la secuencia aislada del ácido nucleico que codifica el CAR comprende la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID No: 8.

37. (original) El vector de la reivindicación 34, donde el dominio de unión del antígeno es un anticuerpo o uno de sus fragmentos de unión con el antígeno.

38. (original) El vector de la reivindicación 37, donde el fragmento de unión con el antígeno es un Fab o un scFv.

39. (original) El vector de la reivindicación 34, donde el dominio de unión con el antígeno se une a un antígeno tumoral.

40. (original) El vector de la reivindicación 39, donde el antígeno tumoral se asocia con una condición hematológica de malignidad.

41. (original) El vector de la reivindicación 39, donde el antígeno tumoral se asocia con un tumor sólido.
42. (original) El vector de la reivindicación 39, donde la región de señalización costimuladora comprende el dominio intracelular de una molécula costimuladora seleccionada a partir del grupo conformado por CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelin, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, glicolípido F77, EGFRvIII, GD-2, Y-ESO-1 TCR MAGE A3 TCR y cualquiera de sus combinaciones.
43. (original) El vector de la reivindicación 34, donde la región de señalización costimuladora comprende el dominio intracelular de una molécula costimuladora seleccionada a partir del grupo conformado por CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno -1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, KG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83, y cualquiera de sus combinaciones.
44. (original) El vector de la reivindicación 34, donde el dominio de señalización CD3 zeta se codifica mediante la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID No: 18.
45. (original) Un método para estimular una respuesta inmune mediada por las células T para una población de células o tejidos objetivos en un mamífero,

en donde dicho método comprende la administración a un mamífero de una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un CAR en donde este último comprende un dominio de unión de antígeno, una región de señalización costimuladora, y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia aminoácida del SEQ ID No.: 24, donde el dominio de unión de antígeno se selecciona para reconocer específicamente la población celular o de tejidos del objetivo.

46. (original) Un método para proporcionar una inmunidad antitumoral en un mamífero, donde dicho método comprende la administración al mamífero de una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un CAR donde este último comprende un dominio de unión de antígeno, una región de señalización costimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.: 24 proporcionando de esta manera inmunidad antitumoral en el mamífero.

47. (original) Un método para el tratamiento de un mamífero que padezca una enfermedad, trastorno o condición que se asocien con una expresión elevada de un antígeno tumoral, en donde el método comprende la administración al mamífero de una cantidad eficaz de una célula genéticamente modificada para expresar un CAR en donde este último comprende un dominio de unión de antígenos, una región de señalización costimuladora y un dominio de

señalización CD3 zeta conformado por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, tratando de esta manera al mamífero.

48. (original) El método de la reivindicación 47, donde la célula es del tipo autóloga T.

49. (original) El método de la reivindicación 47, donde el antígeno tumoral se selecciona a partir del grupo conformado por CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelin, CD33/IL3Ra, C-Met, PSMA, Glicolipido F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR, y cualquiera de sus combinaciones.

50. (original) Un método para el tratamiento de un humano que presente leucemia linfocítica crónica, donde el método comprende la administración al humano de un célula T modificada genéticamente para expresar un CAR, donde este ultimo comprende un dominio de unión de antígeno, una región de señalización costimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.: 24.

51. (original) El método de la reivindicación 50, en donde el humano es resistente por lo menos a un agente quimioterapéutico.

52. (original) El método de la reivindicación 50, donde la leucemia linfocítica crónica es leucemia refractaria CD19+ linfoma.

53. (original) Un método para generar una población persistente de células T modificadas genéticamente en un humano diagnosticado con cáncer, donde el método comprende la administración al humano de una célula T modificada genéticamente para expresar un CAR en donde este ultimo comprende un dominio de unión de antígeno, una región de señalización costimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.: 24, donde la población persistente de células T modificadas genéticamente persiste en el humano durante un mes como mínimo posterior a la administración.
54. (original) El método de la reivindicación 53, donde la población persistente de células T modificadas genéticamente comprende como mínimo una célula seleccionada a partir del grupo conformada por una célula T que se administro al humano, una progenie de una célula T que se administro al humano y una combinación de las anteriores.
55. (original) El método de la reivindicación 53, donde la población persistente de células T modificadas genéticamente comprende una célula de memoria T.
56. (original) El método de la reivindicación 53, donde el cáncer es leucemia linfocítica crónica es leucemia refractaria CD19+ y linfoma.

57. (original) El método de la reivindicación 53, donde el cáncer es leucemia linfocítica crónica

58. (original) El método de la reivindicación 53, donde la población persistente de las células T genéticamente modificadas persiste en el humano durante tres meses como mínimo después de la administración.

59. (original) El método de la reivindicación 53, donde la población persistente de células genéticamente modificadas persiste en el humano como mínimo durante cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce meses, dos años o tres años después de la administración.

60. (original) El método de la reivindicación 56, donde se trata la leucemia linfocítica crónica.

61. (original) Un método para expandir una población de células T modificadas genéticamente en un humano al cual se le diagnostica cáncer, y el método comprende la administración a un humano de células T modificadas genéticamente para expresar un CAR, donde este último comprende un dominio de unión de antígenos, una región de señalización costimuladora, y un dominio de señalización CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, donde la célula T modificada

022

genéticamente que se administro produce una población de células T de progenie en el humano.

62. (original) El método de la reivindicación 61, donde las células T de progenie en el humano comprenden una célula T de memoria.
63. (original) El método de la reivindicación 61, donde la célula T es del tipo de célula T autóloga.
64. (original) El método de la reivindicación 61, donde el humano es resistente como mínimo a un agente quimioterapéutico.
65. (original) El método de la reivindicación 61, donde el cáncer es leucemia linfocítica crónica.
66. (original) El método de la reivindicación 65, donde la leucemia linfocítica crónica es leucemia refractaria CD19+ linfoma.
67. (original) El método de la reivindicación 61, donde la población de células T de progenie persiste en el humano durante tres meses después de la administración.

- 122
68. (original) El método de la reivindicación 61, donde la población de células T de progenie persiste en el humano durante cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez once, doce meses, dos años o tres años como mínimo después de la administración.
69. (original) El método de la reivindicación 61, donde se somete el cáncer a tratamiento.
70. (nueva) Una secuencia aislada del ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimerice (CAR) donde este ultimo comprende un dominio de unión del antígeno, un dominio de transmembrana, una región de señalización costimuladora, y un dominio de señalización CD3 zeta, donde el dominio de señalización CD3 zeta comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24, además donde la mencionada secuencia aislada del ácido nucleico comprende la secuencia de SEQ ID No.: 9.
71. (nueva) La secuencia aislada del ácido nucleico de la reivindicación 70, donde el CAR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.: 12.
72. (nueva) La secuencia aislada del ácido nucleico de la reivindicación 70, que comprende la secuencia del acido nucleico de SEQ ID No.: 8.

73. (nueva) La secuencia aislada del ácido nucleico de la reivindicación 70, donde el dominio de unión del antígeno es un anticuerpo o un fragmento de unión del antígeno.
74. (nueva) La secuencia aislada del ácido nucleico de la reivindicación 73, donde el fragmento de unión con el antígeno es un Fab o un scFv.
75. (nueva) La secuencia aislada del ácido nucleico de la reivindicación 70, donde el dominio de unión con el antígeno se une a un antígeno tumoral.
76. (nueva) La secuencia aislada del ácido nucleico de la reivindicación 75, donde el antígeno tumoral se asocia con una condición hematológica maligna.
77. (nueva) La secuencia aislada del ácido nucleico de la reivindicación 75, donde el antígeno tumoral se asocia con un tumor sólido.
78. (nueva) La secuencia aislada del ácido nucleico de la reivindicación 75, donde el antígeno tumoral se selecciona a partir del grupo conformado por CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelin, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, glicolípido F77, EGFRvIII, GD-2, Y-ESO-1 TCR MAGE A3 TCR y cualquiera de sus combinaciones.

79. (nueva) La secuencia aislada del ácido nucleico de la reivindicación 70, donde la región de la señalización costimuladora comprende el dominio intracelular de una molécula costimuladora seleccionada a partir del grupo conformado por CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno -1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, KG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente al CD83, y cualquiera de sus combinaciones.
80. (nueva) La secuencia aislada del ácido nucleico de la reivindicación 70, donde el dominio de señalización CD3 zeta se codifica por la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID No.: 18.
81. (nueva) Un receptor aislado de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión con el antígeno, un dominio de transmembrana, una región de señalización costimuladora y un dominio de señalización CD3 zeta, donde el dominio de señalización CD3 zeta comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, donde además el mencionado CAR se expresa mediante una secuencia del ácido nucleico que comprende la secuencia de SEQ ID No.: 9.
82. (nueva) El CAR aislado de la reivindicación 81, donde dicho CAR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No.: 12.

83. (nueva) El CAR aislado de la reivindicación 81, donde el dominio de la unión del antígeno es un anticuerpo o u fragmento de dicha unión con el antígeno.
84. El CAR aislado de la reivindicación 83, donde el fragmento de unión con el antígeno es un Fab o un scFv.
85. (nueva) El CAR aislado de la reivindicación 81, donde el dominio de unión con el antígeno se une a un antígeno tumoral.
86. (nueva) El CAR aislado de la reivindicación 85, donde el antígeno tumoral se asocia con una condición hematológica maligna.
87. (nueva) El CAR aislado de la reivindicación 85, donde el antígeno tumoral se asocia con un tumor solido.
88. (nueva) El CAR aislado de la reivindicación 85, donde el antígeno tumoral se selecciona a partir del grupo conformado por CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelin, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, glicolipido F77, EGFRvIII, GD-2, Y-ESO-1 TCR MAGE A3 TCR y cualquiera de sus combinaciones.
89. (nueva) El CAR aislado de la reivindicación 81, donde la región de señalización costimulatoria comprende el dominio intracelular de una

422

molécula costimuladora seleccionada a partir del grupo conformado por CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno -1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, KG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente al CD83, y cualquiera de sus combinaciones.

Declaracion según la Regla 46.4

De acuerdo con las modificaciones a las reivindicaciones según el Artículo 19, se adicionaron las nuevas reivindicaciones 70 – 89. Las reivindicaciones 1 – 89 quedan de esta manera pendientes en la presente solicitud.

Las reivindicaciones 1 hasta 69 continúan sin modificaciones.

Las nuevas reivindicaciones 70 – 89 describieron características reveladas en la especificación. Básicamente, las reivindicaciones independientes reivindican el texto 70 y 81 SEQ ID NO: 9. Se encuentra un soporte para las nuevas reivindicaciones 70 – 89, entre otros aspectos, en la respectiva página, líneas 1 – 31, Tabla 5 de la página 87 y Figura 12 de la especificación según su radicación.

No se introduce ningún aspecto novedoso por razón de estas modificaciones a las reivindicaciones.

Cordial saludo,

THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

Julio 2, 2012

Fecha

Por:

QUANG D. NGUYEN, Ph.D., J.D

Registration No. 52,066

RIVERSIDE LAW LLP

300 Four Falls Corporate Center, Suite 710

West Conshohocken, PA 19428

Telephone: (215) 268-3888

Direct: (215) 268-3885

Facsimile: (215) 268-3871

E-Mail: qnquyen@riversidelaw.com

Attorney for Applicants

022

272

TRATADO DE COOPERACIÓN PARA PATENTES

De: La AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Para: QUANG D. NGUYEN

RIVERSIDE LAW, LLP

300 FOUR FALL CORPORATE CENTER,

SUITE 107

300 CONSHOHOCKEN STATE ROAD

WEST CONSHOHOCKEN, PA 19428

TCP

NOTIFICACIÓN DE REMISIÓN DEL REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL ASÍ COMO DE LA OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL, O LA DECLARACIÓN PERTINENTE.

(TCP Regla 44,1)

Fecha de envío: 01/Mayo/2012

Referencia del Solicitante o Agente: 46483-6001-00-WO.601218

PARA ACCIONES SUBSECUENTES: Ver párrafos 1 y 4 más adelante.

Aplicación Internacional número: PCT/US 11/64191

Fecha de Diligenciamiento internacional: Diciembre 9 de 2011 (09.12.2011)

Solicitante: DIRECTIVOS DE LA UNIVERSIDAD DE PENNSYLVANIA.

1. ☒ Se notifica al solicitante mediante la presente que el reporte de búsqueda internacional y la opinión escrita de la Autoridad de Búsqueda Internacional han sido establecidos y se comunican a continuación:

Diligenciamiento de enmiendas y declaración bajo el Artículo 19:

El solicitante está en el derecho, si él o ella así lo desea, de enmendar las reclamaciones de la aplicación internacional (Ver regla 46):

¿Cuándo? El límite de tiempo para diligenciar tales enmiendas es normalmente de dos meses desde la fecha de comunicación del reporte de internacional.

¿Dónde? Directamente a la Oficina Internacional de la OMPI, Chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland. Fax No. +41 22 338 82 70

Para instrucciones más detalladas, ver la *Guía del Solicitante TCP*, fase internacional, parágrafos 9.004 – 9.011.

2. ☐ Mediante la presente se notifica al solicitante que ningún reporte de búsqueda internacional ha de ser interpuesto y que la declaración en el Artículo 17(2)(a) para tal efecto así como la opinión escrita de la Autoridad de Búsqueda Internacional se da por transmitida con la presente.

3. ☐ **Con relación a cualquier protesta** en contra del pago de (una) tarifa(s) adicional bajo la Regla 40.2, se le notifica al solicitante que:

☐ La protesta junto con la decisión al respecto ha sido transmitida a la Oficina Internacional junto con cualquier solicitud para remitir los textos tanto de la protesta como de la decisión al respecto para las oficinas designadas.

☐ Ninguna decisión ha sido tomada aún con respecto a la protesta; el solicitante será notificado tan pronto como se tome una decisión.

4. Recordatorios.

El solicitante podrá entregar comentarios de modo informal sobre la opinión escrita de la Autoridad de Búsqueda Internacional a la Oficina internacional. La Oficina Internacional enviará una copia de tales comentarios a todas las oficinas encargadas a no ser que un reporte internacional de examinación preliminar se haya establecido o vaya a ser establecido. Transcurrido el tiempo de vencimiento de 30 meses a partir de la fecha prioritaria, estos comentarios también estarán disponibles al público.

Poco tiempo después del vencimiento de los **18 meses** desde la fecha de prioridad, la aplicación internacional será publicada por la Oficina Internacional. Si el solicitante desea evitar o posponer la publicación, una notificación de retiro de la aplicación internacional o del reclamo de prioridad, debe llegar a la Oficina Internacional antes de que se completen las preparaciones técnicas para la publicación internacional (Reglas 90bis y 90bis.3)

Dentro de un periodo de **19 meses** desde la fecha de prioridad, pero solo en relación con algunas oficinas designadas, se deberá diligenciar un requerimiento

para una prueba preliminar internacional si el solicitante desea posponer la entrada a la fase nacional **hasta por 30 meses** desde la fecha de prioridad (en algunas oficinas incluso más tiempo); de lo contrario, el solicitante deberá, **dentro de un periodo de 20 meses** desde la fecha de prioridad, realizar las acciones prescritas para la entrada a la fase nacional ante las Oficinas designadas.

En relación con otras Oficinas designadas, el tiempo límite es de **30 meses** (o más) aplicará incluso si ningún requerimiento es diligenciado dentro de los 19 meses.

Para detalles acerca de los tiempos límite, Oficina por oficina, ver www.wipo.int/per/en/text/time_limits.html y la *Guía de solicitante TCP*, Capítulos Nacionales.

Nombre y dirección de envío del ISA/ Parada de correo TCP. Attn: ISA/EUA Comisionado para patentes P.O. Box 1450, Alexandria Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273. 3201	Funcionario Autorizado Lee W. Young Oficina de ayuda TCP: 571 – 272 – 4300 Teléfono No. TCP OSP. 571 – 272 -7774
---	---

*Yo, Juan V. Duggirala, traductor e intérprete oficial con Cl. 0292 del 2009 y registrado en el Ministerio de Relaciones Exteriores, certifico que la anterior es una traducción exacta del documento original escrito en inglés. Para CONSTANCIA adhiero mi sello oficial y mi firma en Bogotá, este 17 de Junio del 2013.
(Celular: 3174031008, E-mail: juanviyai@gmail.com).*

TRATADO DE COOPERACIÓN PARA PATENTES

De: La AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Para: QUANG D. NGUYEN
RIVERSIDE LAW, LLP
300 FOUR FALL CORPORATE CENTER,
SUITE 107
300 CONSHOHOCKEN STATE ROAD
WEST CONSHOHOCKEN, PA 19428

TCP

NOTIFICACIÓN DE REMISIÓN DEL REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL ASÍ COMO DE LA OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL, O LA DECLARACIÓN PERTINENTE.

(TCP Regla 44,1)

Fecha de envío: 01/Mayo/2012
Referencia del Solicitante o Agente: 46483-6001-00-WO.601218
PARA ACCIONES SUBSECUENTES: Ver párrafos 1 y 4 más adelante.
Aplicación Internacional número: PCT/US 11/64191
Fecha de Diligenciamiento internacional: Diciembre 9 de 2011 (09.12.2011)
Solicitante: DIRECTIVOS DE LA UNIVERSIDAD DE PENNSYLVANIA.

1. ☒ Se notifica al solicitante mediante la presente que el reporte de búsqueda internacional y la opinión escrita de la Autoridad de Búsqueda Internacional han sido establecidos y se comunican a continuación:

Diligenciamiento de enmiendas y declaración bajo el Artículo 19:

El solicitante está en el derecho, si él o ella así lo desea, de enmendar las reclamaciones de la aplicación internacional (Ver regla 46):

¿Cuándo? El límite de tiempo para diligenciar tales enmiendas es normalmente de dos meses desde la fecha de comunicación del reporte de internacional.

¿Dónde? Directamente a la Oficina Internacional de la OMPI, Chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland. Fax No. +41 22 338 82 70

Para instrucciones más detalladas, ver la *Guía del Solicitante TCP*, fase internacional, parágrafos 9.004 – 9.011.

2. ☐ Mediante la presente se notifica al solicitante que ningún reporte de búsqueda internacional ha de ser establecido y que la declaración en el Artículo 17(2)(a) para tal efecto así como la opinión escrita de la Autoridad de Búsqueda Internacional se da por transmitida con la presente.

3. ☐ **Con relación a cualquier protesta** en contra del pago de (una) tarifa(s) adicional bajo la Regla 40.2, se le notifica al solicitante que:

☐ La protesta junto con la decisión al respecto ha sido transmitida a la Oficina Internacional junto con cualquier solicitud para remitir los textos tanto de la protesta como de la decisión al respecto para las oficinas designadas.

☐ Ninguna decisión ha sido tomada aún con respecto a la protesta; el solicitante será notificado tan pronto como se tome una decisión.

4. Recordatorios.

El solicitante podrá entregar comentarios de modo informal sobre la opinión escrita de la Autoridad de Búsqueda Internacional a la Oficina internacional. La Oficina Internacional enviará una copia de tales comentarios a todas las oficinas encargadas a no ser que un reporte internacional de examinación preliminar se haya establecido o vaya a ser establecido. Transcurrido el tiempo de vencimiento de 30 meses a partir de la fecha prioritaria, estos comentarios también estarán disponibles al público.

Poco tiempo después del vencimiento de los **18 meses** desde la fecha de prioridad, la aplicación internacional será publicada por la Oficina Internacional. Si el solicitante desea evitar o posponer la publicación, una notificación de retiro de la aplicación internacional o del reclamo de prioridad, debe llegar a la Oficina Internacional antes de que se completen las preparaciones técnicas para la publicación internacional (Reglas 90bis y 90bis.3)

Dentro de un periodo de **19 meses** desde la fecha de prioridad, pero solo en relación con algunas oficinas designadas, se deberá diligenciar un requerimiento para una prueba preliminar internacional si el solicitante desea posponer la entrada a la fase nacional **hasta por 30 meses** desde la fecha de prioridad (en algunas oficinas incluso más tiempo); de lo contrario, el solicitante deberá, **dentro de un periodo de 20 meses** desde la fecha de prioridad, realizar las acciones prescritas para la entrada a la fase nacional ante las Oficinas designadas.

En relación con otras Oficinas designadas, el tiempo límite es de **30 meses** (o más) aplicará incluso si ningún requerimiento es diligenciado dentro de los 19 meses.

Para detalles acerca de los tiempos límite, Oficina por oficina, ver www.wipo.int/per/en/text/time_limits.html y la *Guía de solicitante TCP*, Capítulos Nacionales.

Nombre y dirección de envío del ISA/ Parada de correo TCP. Altn; ISA/EUA Comisionado para patentes P.O. Box 1450, Alexandria Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273. 3201	Funcionario Autorizado Lee W. Young Oficina de ayuda TCP: 571 – 272 – 4300 Teléfono No. TCP OSP. 571 – 272 -7774
---	---

*Yo, Juan V. Duggirala, traductor e intérprete oficial con CI. 0292 del 2009 y registrado en el Ministerio de Relaciones Exteriores, certifico que la anterior es una traducción exacta del documento original escrito en inglés. Para CONSTANCIA adhiero mi sello oficial y mi firma en Bogotá, este 17 de Junio del 2013.
(Celular: 3174031008, E-mail: juanviyai@gmail.com).*

N
3

Tratado De Cooperación Para Patentes - TCP

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(TCP Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Referencia del Solicitante o Agente: 46483-6001-00-WO.601218

PARA ACCIONES SUBSECUENTES: Ver Formulario TCP/ISA/220. O
cuando sea aplicable, el ítem 5.

Aplicación Internacional número: PCT/US 11/64191

Fecha de Diligenciamiento internacional: Diciembre 9 de 2011 (09.12.2011)

(Más temprana) Fecha de Prioridad: Diciembre 9 de 2011 (09.12.2011)

Solicitante: DIRECTIVOS DE LA UNIVERSIDAD DE PENNSYLVANIA.

Este Reporte de búsqueda internacional ha sido preparado por la Autoridad de Investigación Internacional y es transmitido al solicitante de acuerdo con lo dispuesto en el Artículo 18. Una copia está siendo remitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de búsqueda internacional consta de 4 hojas.

☐ Esta acompañado además de una copia de cada documento anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte.

a) Con relación al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo con base en:

☒ La aplicación internacional en el idioma en el que fue diligenciada.

☐ Una traducción de la aplicación internacional al idioma _____, que es el idioma que corresponde de una traducción presentada para los propósitos de la búsqueda Internacional (Reglas 12.3(a) y 23.1(b))

b) ☐ Este Reporte de búsqueda internacional ha sido interpuesto teniendo en cuenta la **rectificación de un error obvio** autorizado por o notificado a esta Autoridad bajo la Regla 91 (Regla 43.6bis(a)).

c) ☒ Con relación a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos revelados en la aplicación internacional. (Ver casilla No. I)

2. ☐ Algunos requerimientos fueron hallados inescrutables (Ver casilla No. II)

3. ☐ Hace falta la Unidad de Intervención (Ver casilla No. III)

4. En relación con el título

☒ El texto ha sido aprobado como lo presentó el solicitante.

☐ Se ha sido establecido por esta autoridad que el texto se lea como se indica:

5. Con relación al resumen:

☒ El texto ha sido aprobado como lo presentó el solicitante

☐ El texto ha sido establecido por esta Autoridad como aparece en la casilla IV, de acuerdo con la Regla 38.2. El solicitante podrá, dentro de un mes a partir de la fecha de envío de este Reporte de Búsqueda Internacional, enviar comentarios a esta Autoridad.

6. Con relación a los dibujos,

a) La figura de los dibujos a ser publicados con el resumen es la Figura

No. _____

☐ Como lo sugirió el solicitante

☐ Como fue seleccionada por esta Autoridad, porque el solicitante

No sugirió una figura.

☐ Como fue seleccionado por esta Autoridad, porque esta figura

caracteriza mejor el invento.

b) ☒ Ninguna de las figuras será publicada con el resumen.

Casilla No. 1 Secuencia(s) de nucleótidos y/o aminoácidos.

(Continuación del ítem 1.c de la primera página)

1. Con relación a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos revelados en la aplicación internacional, esta opinión ha sido emitida con base en el listado secuencial presentado:

a) (Medio)

☐ En papel

☐ En forma electrónica

b) (Tiempo)

☐ Como está archivado en la aplicación internacional.

☒ Junto con la aplicación internacional en forma electrónica

☐ Subsecuentemente a esta Autoridad con el propósito de búsqueda

2. ☐ Adicionalmente, en el caso de que más de una versión o copia del listado secuencial hayan sido presentadas, se requiere que la información contenida en las copias adicionales presentadas sea idéntica a la información presentada en la aplicación como fue recibida o que no vaya más allá de la información previamente suministrada.

3. Comentarios adicionales

GenCore 6.3: SEQ ID No: 24. 12. 8

*Yo, Juan V. Duggirala, traductor e intérprete oficial con CI. 0292 del 2009 y registrado en el Ministerio de Relaciones Exteriores, certifico que la anterior es una traducción exacta del documento original escrito en inglés. Para CONSTANCIA adhiero mi sello oficial y mi firma en Bogotá, este 17 de Junio del 2013.
(Celular: 3174031008, E-mail: juanviyai@gmail.com).*

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

No. de Aplicación Internacional: PCT/US 11/64191

A. CLASIFICACIÓN DE LA MATERIA OBJETO

IPC(8) – C07H 21/04; A61K 39/00 (2012.01)

USPC – 536/23.4; 424/134.1

De acuerdo a la Clasificación de Patentes Internacional ("IPC") o tanto la clasificación nacional así como la IPC.

B. CAMPOS DE ESTUDIO

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

USPC - 536/23.4; 424/134.1

Documentación buscada además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos se incluyan en los campos de búsqueda

USPC – 424/155.1; 424/143.1; 424/135.1; 435/235.1; 435/320.1; 435/328; 435/344.1; 435/372; 435/372.3; 435/69.6; 435/69.7; 530/387.3; 530/388.22; 530/388.85; 536/23.53; 536/23.5; 424/93.21; 530/350.

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base y, cuando aplique, términos de búsqueda utilizados)

PubWEST (PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB); Google Patents; Google Scholar; "Chimeric T cell receptor" (receptor de células T quimérico), "Chimeric antigen

022

receptor" (receptor antígeno quimérico), "Human CD3 zeta chain intracelular domain" (dominio intracelular de cadena zeta CD3 humana), CD3 zeta, "signaling" (señales), TCRZ; CD3-ZETA; CD247, antígeno CD247, CD3Z, "TIT3 complex" (complejo TIT3), TCRzeta, sustitución conservadora. GenCore 6.3: SEQ ID No: 24, 12, 8.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS COMO RELEVANTES

<u>Categoría</u>	<u>Cita de un documento, con indicativo cuando amerite, sobre los pasajes pertinentes</u>	<u>Relevante para Reclamación No.</u>
A	WO 2010/025177 A1 (Jensen) 4 de marzo 2010 Abstracto, Fig 1.	1-69
A	Milone, et al. Receptores quiméricos que contienen dominios de transducción de señal CD137 hacen de mediadores para la supervivencia de las células T y aumentan eficacia anti-leucemia in vivo. Mol Ther 2009, 17(8);1453-64; Abstracto, Fig. 1a, pg. 8, segundo párrafo	1-69
A	US 2004/043401 A1 (Sadelain, et al.) 4 de marzo 2004 (04.03.2004) Abstracto, SEQ ID No.14	1-69
A	Imai, et al- Receptores quiméricos con capacidad de señal provocan potente cito-toxicidad contra la leucemia linfoblástica aguda. Leukemia 2004, 18(4): 676-684	
A	Sebastyen, et al. TCR Humano que incorpora CD3zeta Inducen emparejamientos altamente preferidos entre cadenas TCRalpha y beta tras la transferencia genética. J. Immunol.	1-69

122

	2008, 180(11):7736-46	
A	US 2009/0257994 A1 (Jensen) 15 de octubre de 2009 (15.10.2009) Abstracto	1-69
A	US 7,319,143 B2 (Gross, et al.) 15 de enero de 2008 (15.01.2008) Abstracto	1-69
A	US 7,265,209 B2 (Jensen) 4 de septiembre de 2007 (04.09.2007) Abstracto, SEQ ID No. 2	1-69
A	US 7,446,191 B2 (Jensen) 4 de noviembre de 2008 (04.11.2008) Abstracto, SEQ ID No. 2	1-69
A	US 7,446,190 B2 (Sadelain, et al) 4 de noviembre de 2008 (04.11.2008) Abstracto, SEQ ID No. 14, 12	1-69
A	US 6,410,319 B1 (Raubitschek, et al) 25 de junio de 2002 (25.06.2002)	1-69

X Se enumeran más documentos en la continuación de la casilla C.

Categorías especiales en los documentos citados:

"A" documento que define el estado del arte general que no se considere de relevancia particular.

"E" solicitud o patente anterior, pero publicada en la fecha del registro internacional o de manera posterior.

"L" documento que puede arrojar duda sobre las reclamaciones de prioridad o el cual se cita para establecer la fecha de publicación de otra cita u otra razón especial (según se especifique)

222

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, uso, exhibición u otro medio de comunicación.

"P" documento publicado previo a la fecha de archivo inicial pero posterior a la fecha de la reclamación.

"T" documento posterior publicado posterior a la fecha de archivo inicial o fecha de prioridad y que no esté en conflicto con la solicitud pero que incluya el entendido o principio de la teoría detrás de la invención.

"X" documento de relevancia particular; la invención reclamada no puede ser considerada como algo novedoso o no puede ser considerada como algo que involucre un paso hacia adelante en la inventiva cuando el documento se considera por sí solo.

"Y" documento de particular relevancia; la invención que se reclama no puede ser considerado como algo que involucre un paso en la inventiva cuando el documento se combina con uno o más documentos de dicho tipo; tal combinación siendo posible de manera evidente para alguien con conocimiento específico de la materia.

"&" documento miembro de la misma familia de patentes.

Fecha de la culminación real de la búsqueda internacional

8 de abril de 2012 (08.04.2012)

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional: 01-MAYO-2012

22

Nombre y dirección de envío del ISA/US Parada de correo PCT. Attn; ISA/US Comisionado para patentes P.O. Box 1450, Alexandria Virginia 22313-1450 Fax No. 571-273. 3201	Funcionario Autorizado Lee W. Young Oficina de ayuda TCP: 571 – 272 – 4300 Teléfono No. TCP OSP. 571 – 272 -7774
--	---

Continuación de DOCUMENTOS CONSIDERADOS COMO RELEVANTES

<u>Categoría</u>	<u>Cita de un documento, con indicativo cuando amerite, sobre los pasajes pertinentes</u>	<u>Relevante para Reclamación No.</u>
A	US 7,514,537 B2 (Jensen) 07 de abril de 2009 (07.04.2009) Abstracto, reclamaciones 1-4; SEQ ID No. 17	1-69
A	WO 2010/085660 A2 (JUNGHANS) 29 de julio de 2010 (29.07.2010) Fig. 28; SEQ ID No. 2	1-69
A	Remisión Directa NCBI NP_00725.1 Glicoproteína Superficial de célula T – CD3 zeta precursor de cadena isoforma 2 [Homo sapiens]. 21 NOV-2010 [Extraído de la internet el 8 de abril de 2012: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/4557431?sat=14&satkey=4227882]	1-69
A	Remisión Directa NCBI NP_932170.1 Glicoproteína Superficial de célula T – CD3 zeta precursor de cadena isoforma 1 [Homo sapiens]. 21 NOV-2010 [Extraído de la internet el 8 de abril de 2012: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/37595565?sat=14&satkey=4224140]	1-69

- 22
- A Call, et al. El receptor de la célula T; rol crítico del ambiente
De la membrana en el ensamble del receptor y su función.
Annu Rev Immunol. 2005, 23:101-125 1-69
- A,P Kalos, et al. Células T con receptores de antígenos quiméricos
cuentan con efectos antitumorales y pueden establecer memo-
ria en pacientes con leucemia. Sci Transl Med. 10 de agosto de
2011, 3(95): 95-73. 1-69
- A,P Porter, et al. Terapia de Receptor de Antígeno Quimérico para
Tumores Malignos de células B. J Cancer. ePub 01. Junio de
2011, 2:331-332. 1-69
- A,P Porter, et al. Células T modificadas con Receptor de Antígeno
Quimérico para en leucemia linfocítica crónica. N Engl J Med.
25 de agosto de 2011, 365(8):725-33. 1-69

Yo, Juan V. Duggirala, traductor e intérprete oficial con Cl. 0292 del 2009 y registrado en el Ministerio de Relaciones Exteriores, certifico que la anterior es una traducción exacta del documento original escrito en inglés. Para CONSTANCIA adhiero mi sello oficial y mi firma en Bogotá, este 17 de Junio del 2013. (Celular: 3174031008, E-mail: juanviyai@gmail.com).

92

TRATADO DE COOPERACIÓN PARA PATENTES

De: La AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Para: QUANG D. NGUYEN

RIVERSIDE LAW, LLP

300 FOUR FALL CORPORATE CENTER,

SUITE 107

300 CONSHOHOCKEN STATE ROAD

WEST CONSHOHOCKEN, PA 19428

TCP

OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD INTERNACIONAL DE BUSQUEDA

(TCP Regla 43Bis,1)

Fecha de envío:	01/Mayo/2012
Referencia del Solicitante o Agente:	46483-6001-00-WO.601218
PARA ACCIONES SUBSECUENTES:	Ver parágrafo2 más adelante.
Aplicación Internacional número:	PCT/US 11/64191
Fecha de Diligenciamiento internacional:	Diciembre 9 de 2011 (09.12.2011)
Fecha de prioridad:	Diciembre 9 de 2011 (09.12.2011)
Clasificación Internacional de Patente(CIP)	
O clasificación e CIP:	IPC (8) – C07H21/04; A61K39/00 (2012.01) USPC – 536/23,4;424/134.1

Solicitante: DIRECTIVOS DE LA UNIVERSIDAD DE PENNSYLVANIA.

1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems:

☒ Casilla No. I Base de la opinión

- 22
- ☐ Casilla No. II Prioridad
 - ☐ Casilla No. III No establecimiento de la opinión con relación a la novedad, paso inventivo y aplicabilidad industrial.
 - ☐ Casilla No. IV Carencia de unidad en cuanto a la invención.
 - ☒ Casilla No. V Declaración razonada bajo la Regla 43Bis.1(a)(i), con relación a la novedad, paso inventivo y aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones apoyando tal declaración.
 - ☐ Casilla No. VI Ciertos documentos citados
 - ☐ Casilla No. VII Ciertos defectos en la aplicación internacional
 - ☐ Casilla No. VIII Ciertas observaciones sobre la aplicación internacional

2. ACCIONES SUBSECUENTES

Si se presenta un requerimiento de prueba internacional preliminar, esta opinión debe ser considerada como una opinión escrita de la Autoridad Internacional de Prueba Preliminar ("AIEP"), excepto que esto no aplique cuando el solicitante escoge otra Autoridad diferente para actuar como AIEP y la AIEP escogida haya notificado a la Oficina Internacional bajo la Regla 66.1bis(b) que las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional no deberán ser consideradas.

Si esta opinión, es, como se describe anteriormente, considerada como una opinión escrita de la AIEP, el solicitante está invitado a presentar ante la AIEP una respuesta escrita junto con las enmiendas, de ser estas necesaria, antes de la expiración de los 3 meses desde la fecha de envío del formulario

2

TCP/ABI/220 o antes de la expiración de los 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde.

Para más opciones, ver el formulario TCP/ABI/220

Nombre y dirección de envío del ABI/ Parada de correo TCP. Altn; ABI/EUA Comisionado para patentes P.O. Box 1450, Alexandria Virginia 22313-1450 Fax No. 571-273. 3201	Funcionario Autorizado Lee W. Young Oficina de ayuda TCP: 571 – 272 – 4300 Teléfono No. TCP OSP. 571 – 272 -7774
---	---

Casilla No. I Bases de esta opinión.

1. Con relación al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo con base en:
☒ La aplicación internacional en el idioma en el que fue diligenciada.
☐ Una traducción de la aplicación internacional al idioma _____, que es el idioma que corresponde de una traducción presentada para los propósitos de la búsqueda Internacional (Reglas 12.3(a) y 23.1(b))
2. ☐ Este Reporte de búsqueda internacional ha sido interpuesto teniendo en cuenta la **rectificación de un error obvio** autorizado por o notificado a esta Autoridad bajo la Regla 91 (Regla 43.6bis(a)).
3. Con relación a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos revelados en la aplicación internacional, esta opinión ha sido emitida con base en el listado secuencial presentado:

862

c) (Medio)

☐ En papel

☐ En forma electrónica

d) (Tiempo)

☐ Como está archivado en la aplicación internacional.

☒ Junto con la aplicación internacional en forma electrónica

☐ Subsecuentemente para esta Autoridad con el propósito de
búsqueda

4. ☐ Adicionalmente, en el caso de que más de una versión o copia del listado secuencial hayan sido presentadas, se requiere que la información contenida en las copias adicionales presentadas sea idéntica a la información presentada en la aplicación como fue recibida o que no vaya más allá de la información previamente suministrada.

5. Comentarios adicionales

GenCore 6.3: SEQ ID No: 24. 12. 8

*Yo, Juan V. Duggirala, traductor e intérprete oficial con Cl. 0292 del 2009 y registrado en el Ministerio de Relaciones Exteriores, certifico que la anterior es una traducción exacta del documento original escrito en inglés. Para CONSTANCIA adhiero mi sello oficial y mi firma en Bogotá, este 17 de Junio del 2013.
(Celular: 3174031008, E-mail: juanviyai@gmail.com).*

22

OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD
DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Aplicación internacional No.
PCT/ US 11/84191

Casilla No. V Declaración razonada según la Regla 43Bis.1(a)(i), con relación a la
novedad, avance inventivo y aplicabilidad industrial; citaciones y
explicaciones apoyando tal declaración

1. Declaración

Novedad (N)	Exigencias: 1-69	Si
	Exigencias: Ninguna	No
Avance Inventivo (AV)	Exigencias: 1-69	Si
	Exigencias: Ninguna	No
Aplicabilidad industrial (AI)	Exigencias: 1-69	Si
	Exigencias: Ninguna	No

2. Citaciones y explicaciones:

Las reclamaciones cumplen con los criterios establecidos en el Artículo 33(2)-(3) del PCT, ya que el artículo previo no indica ni sugiere lo que indica el asunto o materia de la reclamación en cuanto a una secuencia de ácidos nucleicos aislados

específicamente que contienen un receptor de antígeno quimérico (CAR) codificado, mientras que el CAR comprende un dominio de antígeno limitante, un dominio transmembrana, una región de señalización co-estimuladora, y un dominio de señales CD3 zeta, donde el dominio de señales CD3 zeta comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID. No. 24.

WO 2010/025177 A1 (Jensen) divulga un CAR que comprende un dominio de limitación antigénica, un dominio transmembrana, una región de señalización co-estimuladora, y un dominio de señales CD3 zeta (Fig. 1, Abstracto, "Integración de dominios de señales co-estimuladores dentro de un tumor que hace objetivo en el receptor de antígeno quimérico (CAR), tal como el IL13Ra2 específico IL 13- "zetaquina" (IL13zeta), mejora las respuestas mediadas por las células T, en contra de tumores, incluso en ausencia de ligandos expresados para receptores co-estimuladores.").

Jenson no divulga que el dominio de señales CD3 zeta comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID No.: 24.

De modo similar, un documento de nombre "Receptores quiméricos que contienen dominios de transducción de señales CD137 median en la supervivencia mejorada de las células T y aumentan la eficacia anti-leucemia in vivo" por Milone, et al. (de aquí en adelante "Milone"), también divulga un CAR que comprende un dominio vinculante de antígenos, un dominio transmembrana, una región de señales co-

152

estimuladora y un dominio de señales CD3 zeta (Fig 1a, aCD19-BB-zeta, aCD19-28-BB-zeta) y divulga además que "La cDNA para las CARs que contienen una forma truncada del dominio intracelular TCR-zeta (CD19-del zeta), un dominio TCR-zeta de largo completo (aCD19-zeta) o dominio TCR-zeta que va con el dominio intracelular del receptor Milone 4-1BB (aCD19-BB zeta) se generaron en el Hospital de Investigación "St. Jude's Children's Research Hospital [11]" (pg 8, segundo párrafo).

El Milone no divulga que el dominio de señales CD3 zeta comprende la secuencia de amino ácidos SEQ ID No.: 24.

US 2004/043401 de Sadelain et al. (de aquí en adelante "Sadelain") divulga un CAR que comprende un dominio de limitación antigénica, un dominio transmembrana, una región de señalización co-estimuladora, y un dominio de señales CD3 zeta (Abstracto, "Receptores de Células T Quiméricas (TCR) se presentan, las cuales combinan, en una sola especie quimérica, el dominio intracelular de la cadena CD3 zeta, una región de señalización de una proteína co-estimuladora como la CD28, y un elemento de vínculo que interactúa de modo específico con un objetivo establecido), mientras que el dominio de señal de CD3 zeta comprende el aminoácido y la secuencia que es el 99,3% de la identidad de la reclamada SEQ ID No.: 24 (SEQ ID No. 14).

252

La única diferencia entre la (SEQ ID No. 14) de Sadelain y la reclamada SEQ ID No.: 24, es la sustitución conservadora de Gin 14 por Lys. Sin embargo, no hay nada en registro previo que indique que haya motivo para que alguien con capacidades normales en este campo introduzca dicha sustitución en la secuencia de aminoácidos del dominio de señales de CD3 zeta.

Las reclamaciones 1-69 tienen aplicabilidad industrial como lo define el Artículo 33(4) de PCT ya que la materia de estudio puede ser fabricada o utilizada en la industria.

*Yo, Juan V. Duggirala, traductor e intérprete oficial con Cl. 0292 del 2009 y registrado en el Ministerio de Relaciones Exteriores, certifico que la anterior es una traducción exacta del documento original escrito en inglés. Para CONSTANCIA adhiero mi sello oficial y mi firma en Bogotá, este 17 de Junio del 2013.
(Celular: 3174031008, E-mail: juanviyai@gmail.com).*

53

Número de Solicitud Internacional:	PCT/US11/064191
Numero de Publicación Internacional:	Aun no publicada
Numero del Expediente del Abogado:	46483-6001-00-WO.601218

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

Número de Solicitud Internacional: PCT/US2011/064191

Fecha de Radicación Internacional: 9 de Diciembre de 2011 (09.12.2011)

Fecha de Prioridad: 9 de Diciembre de 2010 (09.12.2010)

Solicitante: THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA, et al
(LOS DIRECTIVOS DE LA UNIVERSIDAD DE PENNSYLVANIA)

Titulo: USO DE CELULAS T MODIFICADAS POR RECEPTOR DE ANTIGENO
QUIMERICO PARA EL TRATAMIENTO DE CANCER

ARCHIVADO ELECTRONICAMENTE

Para: The International Bureau of WIPO
(La oficina Internacional de WIPO)
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20
Suiza

SOLICITUD PARA REGISTRO DE UN CAMBIO BAJO LA REGLA 92bis

25

Bajo la Regla 92bis, solicitamos a la Oficina Internacional de WIPO que registre un cambio en los solicitantes en la solicitud internacional arriba mencionada. Por favor adicionar el siguiente Solicitante únicamente para los propósitos de los Estados Unidos de América.

Michael C. MILONE

314 Surrey Road

Cherry Hill, NJ 08002

Estados Unidos de América

Estado de nacionalidad: Estados Unidos

Estado de residencia: Estados Unidos

Adjunto se encuentran como soporte a esta solicitud las copias de los siguientes documentos

1. Poder de Abogado del PCT firmado por Jennifer Langenberger, Director, Propiedad Intelectual, autorizada y actuando en nombre del Solicitante THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA; y
2. Poder de Abogado de PCT firmado por los Solicitantes/Inventores Carl H. JUNE, Bruce L. LEVINE, David L. PORTER, Michael D.KALOS y el Solicitante/inventor recientemente adicionado Michael C. MILONE.
3. Reemplazo de las páginas 1-2 de la solicitud del PCT

53

Esta solicitud se presenta antes del vencimiento del periodo de 30 meses que comienza en la primera fecha de prioridad

Por favor notifique a todos los funcionarios designados de los cambios, y notifique al agente abajo firmante que los cambios han sido registrados

Respetuosamente presentado por:

THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA, et al.

21 de Mayo de 2013

Por: (Firma ilegible)

Quang D. Nguyen, Ph.D., J.D.

Registro No.: 52,066

Reverside Law, LLP

300 Four Falls Corporate Center, Suite 710

300 Conshohocken, PA 19428

215268-3880 (principal)

215-268-3871(fax)

215-268-3885 (directo)

Correo electrónico: qnguyen@riversiledaw.com

Abogado de los Solicitantes

952

Número de solicitud Internacional: _____

Fecha de Registro Internacional: _____

Nombre del la Oficina receptora y de "Solicitud Internacional de PCT"

Referencia del archivo del agente o solicitante

(si lo desea)(máximo 12 caracteres)

46483-6001-00-WO.601218

**SOLICITUD DE REEMPLAZO DEL PCT (TRATADO DE COOPERACION DE
PATENTES)**

El suscrito solicita que la presente solicitud internacional sea procesada de
acuerdo con el Tratado de Cooperación de Patentes

Casilla n. I TITULO DEL INVENTO USO DE CELULAS T MODIFICADAS POR RECEPTOR DE ANTIGENO QUIMERICO PARA EL TRATAMIENTO DE CANCER	
Casilla n. II SOLICITANTE Esta persona también es el inventor	
Nombre y dirección: (apellidos seguidos por los nombres; para una entidad legal, la designación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de dirección indicado en esta casilla es el Estado del Solicitante (este es, el país) de residencia, si no se indica el Estado de Residencia a continuación.) THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA Center for Technology Transfer	Teléfono No.
	Fax No.:
	Telégrafo No.

25

3160 Chestnut Street, Suite 200 Philadelphia, PA 191041-6283 Estados Unidos de América	Número de registro del Solicitante con la oficina:
--	---

ESTADO(Esto es, el país) de nacionalidad: Estados Unidos		Estado (esto es, el país) de residencia: Estados Unidos		
Esta persona está haciendo la solicitud Para los propósitos de:	Todos los estados designados	Todos los estados Designados excepto los Estados Unidos de América: X	Únicamente los Estados Unidos de América	Los Estados indicados en la casilla suplementaria.

Casilla n. III SOLICITANTES Y/O INVENTORES ADICIONALES	
Nombre y dirección: (apellidos seguidos por los nombres; para una entidad legal, la designación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de dirección indicado en esta casilla es el Estado del Solicitante (este es, el país) de residencia, si no se indica el Estado de Residencia a continuación.) JUNE, Carl H. 409 Baird Road Merion Station, PA 19066 Estados Unidos de América	Esta persona es: Únicamente el solicitante: ____ El Solicitante e inventor: <u>X</u> Únicamente el inventor (si marca esta casilla, no diligencie la siguiente casilla): ____
	Número de registro del solicitante con la Oficina:

ESTADO(Esto es, el país) de nacionalidad:
Estados Unidos

Estado (esto es, el país) de residencia:
Estados Unidos

Esta persona está haciendo la solicitud Para los propósitos de:	Todos los estados designados	Todos los estados Designados excepto los Estados Unidos de América:	Únicamente los Estados Unidos de América: X	Los Estados indicados en la casilla suplementaria.
---	------------------------------	---	--	--

X Los solicitantes o inventores adicionales están listados en una hoja a continuación.

Casilla n. IV AGENTE O REPRESENTANTE COMUN; O DIRECCION PARA CORRESPONDENCIA

La persona abajo identificada por medio del presente ha sido nombrada para actuar en nombre del solicitante ante las Autoridades Internacionales competentes como:
Agente: X Representante Común:

Nombre y dirección: (apellidos seguidos por los nombres; para una entidad legal, la designación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y en nombre del país. NGUYEN, Quang D. Reverside Law, LLP 300 Four Falls Corporate Center, Suite 710 300 Conshohocken State Road West Conshohocken, PA 19428 Estados Unidos de América	Teléfono No. 215.268.3888
	Fax: 215.268.3871
	Telégrafo
	Número de registro del Agente con la Oficina: 52,066

25

Dirección para correspondencia: Marque esta casilla si no ha sido nombrado ningún Agente o Representante Común pero aun así se ha utilizado el espacio de arriba para indicar una dirección especial a la cual debe ser enviada la correspondencia

Continuación de la Casilla n. III SOLICITANTES Y/O INVENTORES ADICIONALES	
Si no se utiliza ninguna de las siguientes sub-casillas , no debe incluirse esta hoja en la solicitud	
Nombre y dirección: (apellidos seguidos por los nombres; para una entidad legal, la designación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de dirección indicado en esta casilla es el Estado del Solicitante (este es, el país) de residencia, si no se indica el Estado de Residencia a continuación.)	Esta persona es:
	Únicamente el solicitante: ____
	El Solicitante e inventor: <u> X </u>
LEVINE, Bruce L. 1258 Liberty Bell Drive Cherry Hill, NJ 08003 Estados Unidos de América	Únicamente el inventor (si marca esta casilla, no diligencie la siguiente casilla): ____
	Número de registro del solicitante con la Oficina:

ESTADO(Esto es, el país) de nacionalidad:	Estado (esto es, el país) de residencia:
Estados Unidos	Estados Unidos

OK

Esta persona está haciendo la solicitud Para los propósitos de:	Todos los estados designados	Todos los estados Designados excepto los Estados Unidos de América:	Únicamente los Estados Unidos de América: X	Los Estados indicados en la casilla suplementaria.
Nombre y dirección: (apellidos seguidos por los nombres; para una entidad legal, la designación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de dirección indicado en esta casilla es el Estado del Solicitante (este es, el país) de residencia, si no se indica el Estado de Residencia a continuación.) PORTER, David L. 821 Crum Creek Road Springfield, Pa. 1964 Estados Unidos de América			Esta persona es: Únicamente el solicitante:____ El Solicitante e inventor: X Únicamente el inventor (si marca esta casilla, no diligencie la siguiente casilla):____ Número de registro del solicitante con la Oficina:	

ESTADO(Esto es, el país) de nacionalidad: Estados Unidos		Estado (esto es, el país) de residencia: Estados Unidos		
Esta persona está haciendo la solicitud Para los propósitos de:	Todos los estados designados	Todos los estados Designados excepto los Estados Unidos de América:	Únicamente los Estados Unidos de América: X	Los Estados indicados en la casilla suplementaria.

128

Nombre y dirección: (apellidos seguidos por los nombres; para una entidad legal, la designación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de dirección indicado en esta casilla es el Estado del Solicitante (este es, el país) de residencia, si no se indica el Estado de Residencia a continuación.) KALOS, Michael D. 716 Carpenter Lane Philadelphia, PA 19119 Estados Unidos de América	Esta persona es: Únicamente el solicitante: _____ El Solicitante e inventor: <u> X </u> Únicamente el inventor (si marca esta casilla, no diligencie la siguiente casilla): _____
	Número de registro del solicitante con la Oficina:

ESTADO(Esto es, el país) de nacionalidad:		Estado (esto es, el país) de residencia:		
Estados Unidos		Estados Unidos		
Esta persona esta haciendo la solicitud Para los propósitos de:	Todos los estados designados	Todos los estados Designados excepto los Estados Unidos de América:	Únicamente los Estados Unidos de América: X 	Los Estados indicados en la casilla suplementaria.
Nombre y dirección: (apellidos seguidos por los nombres; para una entidad legal, la designación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de dirección indicado en esta			Esta persona es: Únicamente el solicitante: _____	

262 ~~262~~
262

casilla es el Estado del Solicitante (este es, el país) de residencia, si no se indica el Estado de Residencia a continuación.)

MILONE, Michael C.
314 Surrey Road
Cherry Hill, NJ 08002
Estados Unidos de América

El Solicitante e inventor: X

Únicamente el inventor (si marca esta casilla, no diligencie la siguiente casilla):

Número de registro del solicitante con la Oficina:

ESTADO(Esto es, el país) de nacionalidad:		Estado (esto es, el país) de residencia:		
Estados Unidos		Estados Unidos		
Esta persona está haciendo la solicitud Para los propósitos de:	Todos los estados designados	Todos los estados Designados excepto los Estados Unidos de América:	Únicamente los Estados Unidos de América: X	Los Estados indicados en la casilla suplementaria.
Los solicitantes o inventores adiciones se listan en otra hoja de continuación				