



No. 14-012252- -00000-0000

Fecha: 2014-01-22 16:11:59 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 112

REPUBLICA DE COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT

EXPEDIENTE :

TITULO: : RECEPTORES COESTIMULADORES DE CAMBIO

CLASE : A61K 48/00 (2006,01) - A61K 38/17 (2006,01)

INVENTORES : Carl H. June / Yangbing Zhao

SOLICITANTE : THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

DOMICILIO : FILADELFIA, PENSYLVANIA, ESTADOS UNIDOS

APODERADO : JUAN CARLOS CUESTA QUINTERO

FECHA : 22 DE ENERO DE 2014

PETITOR

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



No. 14-012252- -00000-0000

Fecha: 2014-01-22 16:11:59
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 379 FASENACIONALII
Folios: 112

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

①



Patente de Invención

SOLICITUD DE:



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I.



Capítulo II

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre:

THE TRUSTEES OF THE
UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

Dirección:

Center for Technology Transfer, 3160
Chestnut Street, Suite 200, Philadelphia,
PA 17104-6283

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos

Lugar de Constitución:

Filadelfia, Pensylvania

Estados Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Número

Cual _____
Empresa Extranjera

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre

JUAN CARLOS CUESTA Q.

Dirección

CALLE 72 No. 10-07 Of. 603

Teléfono:

2113097

Fax:

2554538

E-mail:

contacto@cuestalawyers.com

IDENTIFICACION

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Número

79.339.809

TP 43273

④

INVENTORES

(72)

Carl H. June / Yangbing Zhao

Dirección: 409 Baird Road, Merion Station, PA 19066 / 23 Doncaster Road,
Cherry Hill, NJ 8003

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/US2012/048543

Fecha

27/07/2012

Publicación Internacional No.

WO/2013/019615 A2

Fecha

07/02/2013

⑥

TITULO (54)

RECEPTORES COESTIMULADORES DE CAMBIO

⑦

Clasificación Internacional (51)

A61K 48/00(2006,01) - A61K 38/17(2006,01)

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

Si



No



ESTADOS UNIDOS

29/07/2011

61/513,259

⑨

Comprobante de pago No.

14-5835

Fecha

22/01/2014

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes si fuere el caso
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano.
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la autoridad Internacional de Examen Preliminar
- ☐ Traducción del Examen Preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso el caso copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite al licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito de material biológico
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros

11

FIGURA CARACTERISTICA:

Fig. 1. Receptores Quiméricos

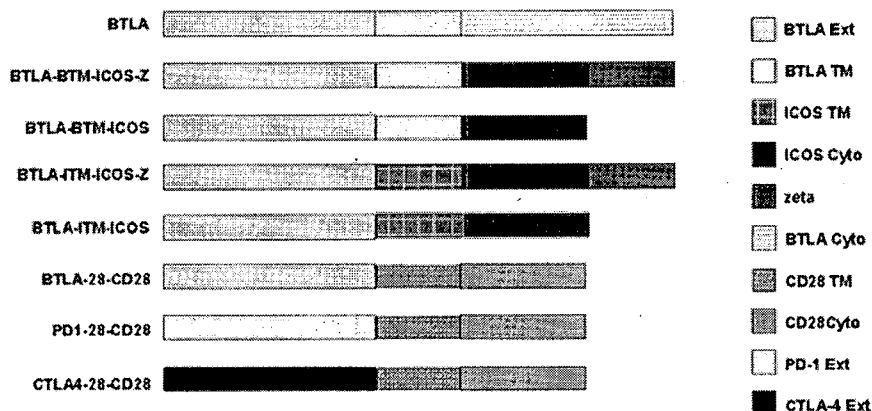


Figura 1A

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN CARLOS CUESTA QUINTERO

FIRMA:

C.C. 79,389,809

T.P. 45,273

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

		EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN ☐ Patente de Invención ☐ Patente modelo de utilidad ☒ PCT	
(21) No. De solicitud PCT/US2012/048543		(51) int. Cl: A61K 48/00 (2006.01) A61K 38/17 21/242 (2011.01)	
(22) Fecha de solicitud 27/07/2012		(71) Solicitante (s) THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA	
(30) Prioridad: 61/513.259 (29.07.2011) US		(72) Interventor (es) JUNE, CARL H.; (US) ZHAO, YANGBING; (CH)	
(33) País: Estados Unidos de América (US)		(74) Apoderado (s) JUAN CARLOS CUESTA QUINTERO	
(54) Título Receptores Coestimuladores de Cambio			
Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT			
(85) Fecha límite inicio Fase Nacional 29/01/2014		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud Fecha: 27/07/2012 No. de solicitud PCT: PCT/US2012/048543		Fecha (07/02/2013) No. Publicación WO2013/019615 A2	

Resumen reivindicación (es):

La presente invención se refiere de una manera general a una proteína de fusión que cuando se manifiesta en una célula puede convertir una señal negativa en una señal positiva en la célula. La proteína de fusión es una proteína quimérica caracterizada porque la proteína comprende por lo menos dos dominios, en donde el primer dominio es un polipéptido que está asociado con una señal negativa y el segundo dominio es un polipéptido que está asociado con una señal positiva. De este modo, la invención comprende receptores de cambio que son capaces de cambiar las señales negativas a señales positivas para la potenciación de una respuesta inmune.

Fig. 1. Receptores Quiméricos

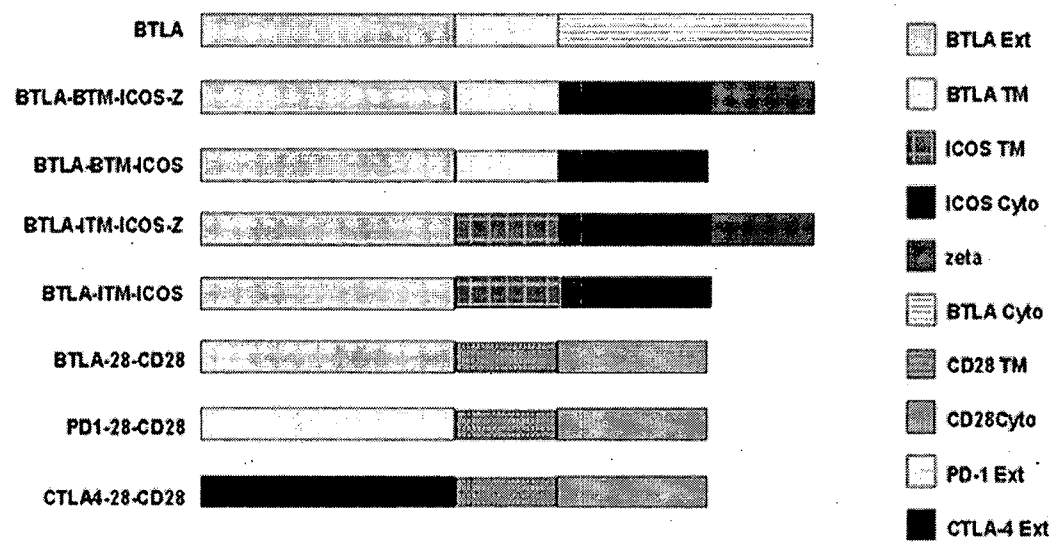


Figura 1A

4

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020		Fecha: ____/____/____ AAAA MM DD 2014 01-22	
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐		Recorrido: 3	
Radicador:		Planilla:	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14-12252	①	2
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:

El CD Anexo contiene un total de 7 Archivos y en Formato Bloc de notas el cual por no cumplir con lo estipulado en la Circular Única no fue procesado.

griselda

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 005836

Bogotá D.C., Enero 20 de 2014 - 14:49:55

RECIBIDO DE : CUESTA Y ASOCIADOS LTDA

NI 800.075.616

***** Soporte del Pago *****

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	557477476	20/01/2014	2.494.000.00

***** Conceptos Pagados *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
2 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	31.000.00	62.000.00
				\$62.000.00

SON: **SESENTA Y DOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-012252- -00000-0000

Fecha: 2014-01-22 16:11:59 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 112

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.slc.gov.co e-mail: info@slc.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Enero 20 de 2014 - 14:49:55

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 005835

Bogotá D.C., Enero 20 de 2014 - 14:49:55

RECIBIDO DE : CUESTA Y ASOCIADOS LTDA

NI 800.075.616

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	557477476	20/01/2014	2.494.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
				\$515.000.00
			=====	

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-012252- -00000-0000

Fecha: 2014-01-22 16:11:59 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 112

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 20 de 2014 - 14:49:55

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned Jennifer Langenberger by the rights that I (we) represent and acting as the Director of Intellectual Property and Legal Representative(s) of The Trustees of the University of Pennsylvania an organization existing under the laws of the Commonwealth of Pennsylvania, in the United States of America and in present execution of its (social) objective, domiciled at Philadelphia Pennsylvania do hereby grant POWER OF ATTORNEY to Mr. Juan Carlos Cuesta Quintero and/or Mrs. Diana Romero Calvo, members of Cuesta & Asociados Ltda., residing in Bogotá, Colombia, and identified with CC 79.339.809 and CC 52.250.482 and with professional card 43.273 CSJ and 121.002 CSJ, respectively, to act on behalf of grantor before any entity, authority and/or person, specially before those Administrative, Contentious-Administrative, Judicial and/or any other, in all matters concerning the following:

1.- To file, obtain and/or register any of the type of Intellectual and Industrial Property right, such as: Patents of Inventions and Model Utility Patents; Industrial Designs, Trademarks, Slogans, Trade Names and emblems or ensigns, and Appellations of Origin; copyrights in any of their presentations (display); sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or extensions, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses, domain names applications. Especially those related to:

2.- To bring actions of opposition, observances, infringement or refutation, reconsideration, complaints, appeals or legal recourses, cancellation, nullity and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, engage facilitation hearings, as well as to intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal, or Contentious-Administrative Trials; in actions or lawsuits or litigation's that grantor initiates or are initiated against him.

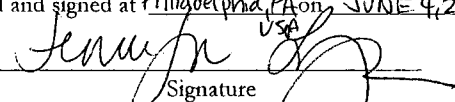
3.- In order that this mandate is sufficient enough for all the matters referenced above, I (we) do hereby expressly grant full and ample POWER OF ATTORNEY to exercise the special rights established under Art. 70 of the Civil Procedure Code, this is: to conciliate, settle, submit to arbitration, waive legal proceedings, defer the harmonious testimony or decisive oath, absolve or acquit positions; and to receive the object related to the litigation or to take possession of the said object. Attorneys may execute any other act that requires a special clause; for any and/or all the provisions mentioned in these instruments.

4.- To exercise Judicial Proxy and to ratify or not the officious agency. Attorneys may also grant power of attorney over the same to act in and out of the Colombian territory.

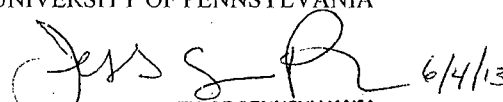
5.- To substitute or delegate this Power of Attorney to act in Colombia and abroad in favor of other or others and to revoke such substitutions or delegations.

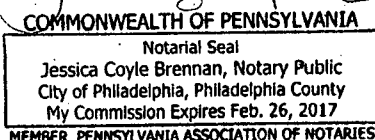
6.- It is expressly stated that attributions listed under this Power of Attorney are merely exemplifying and not limitative of other implicit attributions, therefore, the attorneys -in fact- are authorized to exercise without any restriction whatsoever, all the rights granted by the law in force and/or with the legislation to be enacted in the future, related and/or resulting and/or are the consequence of the subject of this Power and regarding all hereby stated.

Granted and signed at Philadelphia, PA on JUNE 4, 2013


Signature

By: Jennifer Langenberger, Director of Intellectual Property, on behalf of THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

 6/4/13



PODER ESPECIAL

Yo (nosotros), _____, abajo firmante(s), por los derechos que represento(amos) en mi(nuestra) calidad de **REPRESENTANTE LEGAL** de la sociedad _____

constituida bajo las leyes de _____ y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en _____

por el presente instrumento confiero PODER ESPECIAL a favor de Juan Carlos Cuesta Quintero y/o Diana Romero Calvo, miembros de la firma Cuesta & Asociados Ltda., domiciliados en Bogotá, Colombia, identificados con C.C. 79.339.809 y CC 52.250.482 y Tarjetas Profesionales 43.273 CSJ y 121.002 CSJ, respectivamente, para que actuando a nombre del (de la) otorgante lo (la) represente(n) ante cualquier entidad, autoridad, y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso-Administrativo, Judicial y/o de cualquier otra que fuere, en todo lo referente a los siguientes asuntos:

1.- Solicitar, tramitar, inscribir y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, esto es, las Patentes de Invención y Modelos de Utilidad; los Diseños Industriales; los Signos Distintivos, como: Marcas, Lemas, Nombres y Enseñas Comerciales y Denominaciones de Origen; Derechos de Autor; Registros Sanitarios y de Variedades Vegetales; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias, solicitud de nombres de dominio. Caso específico, para _____

2.- Ejercer acciones de oposición, observación, impugnación, reposición, apelación, cancelación, nulidad y demás que se relacionen con derechos derivados de los asuntos indicados y en contra de la competencia desleal, así como participar en audiencias de facilitación intervenir en Juicios Civiles, Comerciales, Penales, Contencioso-Administrativos, en acciones o juicios que promueva o se promuevan en contra del (la) mandante.

3.- Para que en todos los asuntos arriba mencionados este mandato sea suficiente, confiero expresamente este Poder amplio y suficiente, para ejercer las facultades especiales establecidas en el artículo 70 del Código de Procedimiento Civil, esto es: conciliar, transigir, comprometer el pleito en árbitros, desistir del pleito, deferir al juramento decisorio, absolver posiciones, y recibir la cosa sobre la cual verse el litigio o tomar posesión de ella. Los mandatarios podrán ejecutar cualquier otro acto que requiera de cláusula especial para cualquiera o todas las disposiciones que se mencionan en este instrumento.

4.- Ejercer Procuración Judicial, y ratificar o no la agencia oficiosa. Los mandatarios quedan facultados para conferir poder en los asuntos aquí mencionados, para actuar bien dentro o fuera del territorio colombiano.

5.- Sustituir o delegar el presente Poder y revocar tales sustituciones o delegaciones.

6.- Se deja expresa constancia que las facultades enumeradas en este mandato son meramente ejemplificativas y no limitativas de otras facultades implícitas, por cuyo motivo, los mandatarios están autorizados a ejercer, sin restricción alguna, todos los derechos de acuerdo con la ley vigente y/o con la legislación que se promulgue en el futuro, se relacionen y/o emerjan y/o sean consecuencia del objeto del presente Poder y en razón de lo aquí expresado.

Dado y firmado en _____ a _____

Firma

46483-6010-PI-US-600900

PENN X5940

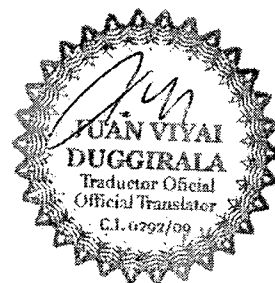
PATENTE

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, nosotros, **Carl H. June**, ciudadano de los Estados Unidos de América, con dirección postal en el 409 Baird Road, Merion Station, PA 19066; y **Yangbing Zhao**, ciudadano de la República Popular de China, tenemos dirección de correo en el 23 Doncaster Rd., Cherry Hill, NJ 08002; de aquí en adelante denominados como los "CEDENTES", y hemos inventado un nuevo y práctico

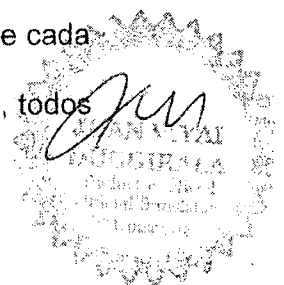
RECEPTORES DE CONMUTACION PARA COESTIMULACION

Y, **CONSIDERANDO QUE**, **Los Socios de la Universidad de Pennsylvania**, de aquí en adelante denominados como los asignatarios, del **3160 Chestnut Street, Suite 200, Philadelphia, Pennsylvania 19104**, una universidad de educación superior en **Pennsylvania**, desean adquirir los derechos completos, titularidad e intereses sobre la invención antes mencionada y las mejoras a la misma al igual que sobre su aplicación provisional, y sobre cualquier solicitud de patente que aplique al mismo, y concerniente a cualquier Nota de Patente que pudiese ser otorgada sobre o como resultado de dicho invento en cualquier país:



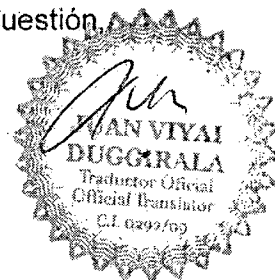
ENTONCES, en consideración y como prueba de recibo o aceptación, por la cual nos regimos, nosotros los cedentes antes mencionados, hemos vendido, asignado, transferido, de manera efectiva a partir de la fecha de ejecución de la presente asignación y por medio de la presente ejecutamos dicha venta, asignación y transferencia y otorgamos al asignatario el derecho completo, titularidad e intereses sobre las invenciones y mejoras y la solicitud provisional y cualquier solicitud de patente que corresponda junto con cualquier extensión, división y renovación o elemento sustitutivo sobre la solicitud de patente en cuestión así como sobre cualquier Nota de Patente que puede llegar a otorgarse sobre esta en los Estados Unidos o cualquier otro país, y sobre cualquier renovación o nueva emisión o extensión de dichas Notas de Patente, y otorgamos y autorizamos al asignatario, para registrar en nuestro nombre las solicitudes de patentes correspondientes para las Notas de Patente en todos los países, a ser disfrutadas y propiedad del asignatario, sus sucesores, asignatarios, designados o representantes legales, en la medida completa en que dichas Notas de Patente lo permitan, o según se reexpidan o extiendan, en la misma medida y extensión de la que nosotros hubiésemos disfrutado si el presente acuerdo de asignación, venta y transferencia no se hubiese llevado a cabo.

Y mediante la presente damos fe de tener el derecho completo de transferir todos los derechos aquí otorgados, y que no hemos ejecutado ningún acuerdo que se encuentre en conflicto con el presente, y además damos fe y acordamos que cada vez que se solicite, ejecutaremos y entregaremos sin demoras innecesarias, todos



los papeles que puedan necesitarse o sean deseables para perfeccionar la titularidad a las mencionadas invenciones o sus mejoras, la solicitud mencionada o las Notas de Patentes para tal asignatario, sus sucesores, asignatarios, designados, o representantes legales, y acordamos comunicar a tal asignatario o a su designado, todos los hechos conocidos respecto de las invenciones o mejoras, la aplicación y Notas de Patente mencionadas, a testificar en cualquier procedimiento legal, a firmar cualquier documento legal, a ejecutar cualquier declaración y solicitud divisional, de extensión o reexpedición y solicitudes internacionales, para lograr todos los derechos legales y en general ayudar de todo modo posible a los asignatarios, sus sucesores, asignatarios, designados y representantes legales para que obtengan y puedan aplicar la protección de patentes en su beneficio en lo que concierne a los inventos descritos y sus mejoras en cualquier país.

Y autorizamos mediante la presente y solicitamos de parte del Comisionado de Patentes y Marcas Registradas de los Estados Unidos y de cualquier funcionario de cualquier país diferente a los Estados Unidos que tenga la función de emitir patentes de solicitudes como se ha descrito, para que expida para el asignatario antes mencionado, como asignatario sobre todos los derechos, titularidad e intereses y cualquier Nota de Patentes sobre tales invenciones o mejoras, incluyendo todas las Notas de Patentes de los Estados Unidos que puedan ser emitidas y otorgadas o a partir o como resultado de la solicitud en cuestión, conforme a los términos de esta cesión.



DANDO FE DE LO ANTERIOR, adjuntamos nuestro sello y firma.

Fecha: 5/30/2012

(Firma Ilegible) – Carl H. June

(Sello)

ESTADO DE PENNSYLVANIA

CONDADO DE PHILADELPHIA

Ante mí, Notario Público en y para el Estado y Condado antes mencionado, este 30 de mayo de 2012, apareció personalmente Carl H. June, quien conocí personalmente y quien ejecutó el instrumento previo en mi presencia y habiendo jurado ante mí, reconoció que el instrumento anterior como su voluntad y que el mismo lo firma, sella y otorga con el propósito aquí indicado y se rige al mismo legalmente y desea que se registre dicho instrumento.

(Firma Ilegible) Notario Público

Mi Comisión vence el: (en blanco)

Sello Notarial: JENNIFER I. LEIGHT – Notaria Pública

CIUDAD DE FILADELFIA, CONDADO DE FILADELFIA

Mi comisión vence el 16 de marzo de 2016

Fecha: 5/30/2012

(Firma Ilegible) – Yangbing Zhao

(Sello)

ESTADO DE PENNSYLVANIA



CONDADO DE PHILADELPHIA

Ante mí, Notario Público en y para el Estado y Condado antes mencionado, este 30 de mayo de 2012, apareció personalmente Yangbing Zhao, quien conocí personalmente y quien ejecutó el instrumento previo en mi presencia y habiendo jurado ante mí, reconoció que el instrumento anterior como su voluntad y que el mismo lo firma, sella y otorga con el propósito aquí indicado y se rige al mismo legalmente y desea que se registre dicho instrumento.

(Firma Ilegible) Notario Público

Mi Comisión vence el: (en blanco)

Sello Notarial: JENNIFER I. LEIGHT – Notaria Pública

CIUDAD DE FILADELFIA, CONDADO DE FILADELFIA

Mi comisión vence el 16 de marzo de 2016

Yo, Juan V. Duggirala Castañeda, Traductor e Interprete Oficial con C.I. No. 0292 de 2009 (U. Nacional) y registrado como tal en el Ministerio de Relaciones Exteriores, certifico que la anterior es una traducción fiel del documento original en Inglés. DANDO FE DE LO ANTERIOR, firmo y adhiero mi sello como traductor oficial en Bogotá, este 15 de enero de 2014.



ASSIGNMENT

WHEREAS, we, Carl H. June, a citizen of the United States of America, having a mailing address of 409 Baird Road, Merion Station, PA 19066; and Yangbing Zhao, a citizen of P.R. China, having a mailing address of 23 Doncaster Rd., Cherry Hill, NJ 08003; hereinafter generally referred to as "ASSIGNORS," have invented a certain new and useful

SWITCH COSTIMULATORY RECEPTORS

for which we have filed U.S. Provisional Application No. 61/513,259, filed July 29, 2011;

AND, WHEREAS, The Trustees Of The University Of Pennsylvania hereinafter referred to as the assignee, of 3160 Chestnut Street, Suite 200, Philadelphia, Pennsylvania 19104, a university of higher education in Pennsylvania, is desirous of acquiring the entire right, title and interest in and to the said inventions or improvements and in and to the said provisional application, and to any patent application(s) corresponding thereto, and in, to and under any and all Letters Patent which may be granted on or as a result thereof in any and all countries:

NOW, THEREFORE, for and in exchange for valuable consideration from the receipt of which is hereby acknowledged and intending to be bound, we, the said assignors, have sold, assigned, transferred and set over, effective as of the execution date of this assignment and by these presents do hereby sell, assign, transfer and set over to said assignee, the entire right, title and interest in and to said inventions or improvements and said provisional application and any and all corresponding patent application(s) and continuations, divisions and renewals of and substitutes for said corresponding patent application(s), and in, to and under any and all Letters Patent which may be granted on or as a result thereof in the United States and any and all other countries, and any reissue or reissues or extension or extensions of said Letters Patent, and assign to and authorize said assignee, to file in our names corresponding patent applications for Letters Patent in all countries, the same to be held and enjoyed by said assignee, its successors, assigns, nominees or legal representatives, to the full end of the term or terms for which said Letters Patent respectively may be granted, reissued or extended, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by us had this assignment, sale and transfer not been made.

AND we hereby covenant that we have full right to convey the entire interest herein assigned, and that we have not executed and will not execute any agreement in conflict herewith, and we further covenant and agree that we will each time request is made and without undue delay, execute and deliver all such papers as may be necessary or desirable to perfect the title to said inventions or improvements, said application and said Letters Patent to said assignee, its successors, assigns, nominees or legal representatives, and we agree to communicate to said assignee, or to its nominee all known facts respecting said inventions or improvements, said application and said Letters Patent, to testify in any legal proceedings, to sign all lawful papers, to execute all disclaimers and divisional, continuing, reissue and foreign applications, to make all

46483-6010-P1-US.600900
PENN X5940
PATENT

rightful oaths, and generally to do everything possible to aid said assignee, its successors, assigns, nominees and legal representatives to obtain and enforce for its or their own benefit proper patent protection for said inventions or improvements in any and all countries.

AND we hereby authorize and request the Commissioner of Patents and Trademarks of the United States and any official of any country or countries foreign to the United States whose duty it is to issue patents of applications as aforesaid, to issue to said assignee, as assignee of the entire right, title and interest, any and all Letters Patent for said inventions or improvements, including any and all Letters Patent of the United States which may be issued and granted on or as a result of the application aforesaid, in accordance with the terms of this assignment.

IN WITNESS WHEREOF, we have hereunto set our hand and seal.

5/30/2012
Date

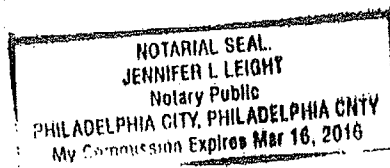
Carl H. June
Carl H. June

(Seal)

STATE OF Pennsylvania :
COUNTY OF Philadelphia : ss.

Before me, a notary public in and for the State and County aforesaid, on this 30th day of May, 2012, personally appeared Carl H. June, who being to me personally known, and who having first executed the foregoing instrument in my presence and have been by me first duly sworn, did acknowledge the foregoing instrument as his/her free deed and act, signed, sealed and delivered by his/her for the purpose therein stated and intending to be legally bound thereby and intending that said instrument be recorded.

Jennifer L. Leight
Notary Public
My Commission Expires:



46483-6010-P1-US.600900
PENN X5940
PATENT

05/30/2012

Date

Yangbing Zhao

Yangbing Zhao

(Seal)

STATE OF Pennsylvania :

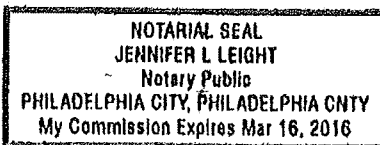
: ss.

COUNTY OF Phila :

Before me, a notary public in and for the State and County aforesaid, on this 30th day of May, 2012, personally appeared Yangbing Zhao who being to me personally known, and who having first executed the foregoing instrument in my presence and have been by me first duly sworn, did acknowledge the foregoing instrument as his/her free deed and act, signed, sealed and delivered by his/her for the purpose therein stated and intending to be legally bound thereby and intending that said instrument be recorded.

Jennifer L. Leight
Notary Public

My Commission Expires:



RECEPTORES COESTIMULADORES DE CAMBIO

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Estadounidense de Serie No. 61/513,259, presentada el 29 de julio de 2011, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El principio general del sistema inmune es que las células T perciben su microambiente, y luego son activadas o inhibidas, dependiendo de las señales que perciben. La familia de genes CD28 está comprendida de 2 genes que transmiten señales positivas, CD28 e ICOS, y 3 genes que proporcionan señales negativas: CTLA4, PD-1 y BTLA (Riley et al., 2005, Blood 105:13-21). Los ligandos para PD-1 son PDL1 y PDL2. Es bien sabido que los ligandos PD-1 se expresan a menudo en el microambiente tumoral, y que la conexión de PD-1 en las células T mediante PDL1 o PDL2 puedan conllevar a la inactivación de la célula T.

En la actualidad el único planteamiento para evitar las señales negativas suministradas por PD-1 o los ligandos BTLA es proporcionar anticuerpos antagonistas o proteínas de fusión que se unen a PD-1 o BTLA, un planteamiento que ahora está siendo probado en ensayos de fase temprana (Cheever et al., 2008, Immunol Rev 222:357-68). Otro planteamiento sería

proporcionar compuestos de moléculas pequeñas que pueden inhibir la transducción de la señal PD-1 o la transducción de la señal BTLA. Los actuales planteamientos para evitar la inactivación de la célula T mediante PD-1 es proporcionar un tratamiento sistémico al paciente con anticuerpos antagonistas PD-1.

Los dos planteamiento mencionados tienen limitaciones en el sentido de que las células T que residen tanto en el microambiente tumoral así como en todo el sistema inmune se evita que sean inactivadas mediante el tratamiento sistémico, y se espera que esto conlleve a la autoinmunidad o síndromes inflamatorios sistémicos en algunos pacientes (Beck et al., 2006, J. Clin Oncol 24:2283-9; Blansfield et al., 2005, J. Immunother 28:593-8; Dougan et al., 2009, Annual review of Immunology 27::83-117).

De este modo, existe la necesidad urgente en la técnica de composiciones y métodos para una forma efectiva de una terapia adoptiva. La presente invención se enfoca en esta necesidad.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se refiere por lo general a un receptor de proteína de fusión que cuando se presenta en una célula puede convertir una señal negativa en una señal positiva para la célula. La proteína de fusión es una proteína quimérica en la que la proteína comprende por lo

menos dos dominios, en donde el primer dominio es un polipéptido que está asociado con una señal negativa y el segundo dominio es un polipéptido que está asociado con una señal positiva. En una modalidad, el primer dominio se une con un factor de inhibición y activa la proteína de fusión, en donde la señal se envía a través del segundo dominio dando como resultado una señal positiva transmitida a la célula. De esta manera, la proteína de fusión es capaz de convertir una señal de otro modo negativa en una señal positiva en la célula. De este modo, se puede considerar que la invención abarca una respuesta inmune. La mejora de una respuesta inmune puede tratar una enfermedad asociada con una respuesta inmune inadecuada.

La invención se basa en el descubrimiento de que las células T pueden ser diseñadas de modo que expresen un receptor de cambio para aprovechar el hecho de que las células T son capaces de percibir su microambiente al ser activadas o inhibidas dependiendo de las señales que perciben. Por ejemplo, la presente invención aprovecha el hecho de que hay ligandos presentes en el microambiente tumoral que inhiben la actividad de las células T. Las células T están diseñadas para expresar un receptor de cambio, en donde el primer dominio es capaz de ser activado por los ligandos inhibidores en el microambiente tumoral y cambia la señal de otra forma inhibidora en una señal positiva a la célula T mediante señalización por el segundo dominio del receptor de cambio. De este modo, la invención proporciona una terapia que proporciona un índice terapéutico

mejorado con menos toxicidad así como la capacidad para proporcionar un tratamiento de una sola vez que es efectivo, y evita la necesidad de la administración continua de anticuerpos.

En algunos casos, las células son generalmente modificadas antes de administrarlas a un paciente que las necesita. Preferentemente, la célula puede ser genéticamente modificada para expresar de manera estable un receptor de cambio deseado de la invención. En otros casos, las células se pueden modificar adicionalmente para expresar un dominio de unión a anticuerpo en su superficie, confiriendo una novedosa especificidad de antígeno que es independiente de MHC (por ejemplo, receptores de antígeno quimérico (CAR)). El CAR combina un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico con un dominio intracelular de la cadena CD3-zeta o una proteína FcγRI en una única proteína quimérica. En este contexto, la célula es diseñada para expresar tanto un receptor de cambio como un CAR.

Las células modificadas de la invención son capaces de replicarse *in vivo* dando como resultado una persistencia de largo plazo que puede conllevar al control tumoral sostenido.

La presente invención proporciona además métodos para hacer los presentes receptores de cambio, y los métodos para usar estos receptores de cambio en el estudio y el tratamiento del cáncer.

Definiciones

Salvo que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos aquí usados tienen el mismo significado que el normalmente conocido por una persona de entendimiento común de la técnica a quien se dirige la invención. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí se pueden usar en la práctica para el examen de la presente invención, los materiales y los métodos preferidos se describen aquí. Al describir y reivindicar la presente invención, se usará la siguiente terminología.

Se entenderá además que la terminología aquí usada es con la finalidad de describir modalidades particulares solamente, y no pretende ser limitante.

Los artículos "un" y "uno" se usan aquí para referirse a uno o a más de uno (es decir, a por lo menos uno) de los objetivos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" se refiere a un elemento o más de un elemento.

"Aproximadamente" se usa aquí cuando se refiere a un valor mensurable tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, abarca variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferentemente $\pm 5\%$, incluso más preferentemente $\pm 1\%$, e incluso más preferentemente $\pm 0.1\%$ del valor especificado, en la medida que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos divulgados.

El término "anticuerpo", según se usa aquí, se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente con un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales de fuentes recombinantes y pueden ser porciones inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos son típicamente tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos en la presente invención pueden existir en una variedad de formas incluyendo, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, Fv, Fab y F(ab)2, así como anticuerpos de una sola cadena y anticuerpos humanizados (Harlow et al., 1999, En: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, En: 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 "antígeno" o "Ag" según se usa aquí se define como una molécula que provoca una respuesta inmune. Esta respuesta inmune puede comprender ya sea una producción de anticuerpo, o la activación de las células específicas inmunológicamente competentes, o ambas. El experto en la técnica entenderá que cualquier macromolécula, incluyendo virtualmente todas las proteínas o péptidos, pueden servir como un antígeno. Más aún, los antígenos pueden ser derivados de ADN recombinante o genómico. Un experto en la técnica entenderá que cualquier ADN, que comprenda una

secuencia de nucleótido o una secuencia parcial de nucleótido que codifica una proteína que provoca una respuesta inmune codifica por lo tanto un "antígeno", como el término que se usa aquí. Además, un experto en la técnica entenderá que un antígeno no necesita ser codificado únicamente por una secuencia de nucleótido de longitud completa de un gen. Es fácilmente evidente que la presente invención incluye, pero no se limita a, el uso de secuencias parciales de nucleótido de más de un gen y que estas secuencias de nucleótido están dispuestas en varias combinaciones para provocar la deseada respuesta inmune. Además, un experto en la técnica entenderá que un antígeno no necesita ser codificado por un "gen" en absoluto. Es fácilmente evidente que un antígeno puede ser generado sintetizado o puede derivarse a partir de una muestra biológica. Dicha muestra biológica puede incluir, pero no limitarse a una muestra de tejido, una muestra de tumor, una célula o un fluido biológico.

El término "efecto antitumoral" según se usa aquí, se refiere a un efecto biológico que se puede manifestar mediante una disminución del volumen del tumor, una disminución del número de células tumorales, una disminución del número de metástasis, un aumento de la expectativa de vida, o una mejora de varios síntomas fisiológicos asociados con la condición cancerosa. Un "efecto antitumoral" también se puede manifestar mediante la capacidad de los péptidos, los polinucleótidos, las células y los anticuerpos de la invención en la prevención de la ocurrencia de un tumor en primer lugar.

Según se usa aquí, el término "autólogo" se puede usar para referirse a cualquier material derivado del mismo individuo a quien este material se va a reintroducir luego.

"Alogénico" se refiere a un injerto derivado de un animal diferente de la misma especie.

"Xenogénico" se refiere a un injerto derivado de un animal de una especie diferente.

Según se usa aquí, "biológicamente activo o inmunológicamente activo" se refiere a proteínas de fusión de acuerdo con la presente invención que tienen una función estructural similar (pero no necesariamente en al mismo grado), y/o una función reguladora similar (pero no necesariamente al mismo grado) que las proteínas individuales de tipo natural que son los bloques de construcción de las proteínas de fusión de la presente invención.

El término "cáncer", según se usa aquí, se define como una enfermedad caracterizada por el rápido y descontrolado crecimiento de las células aberrantes. Las células se pueden expandirse localmente o mediante la corriente sanguínea y el sistema linfático hacia otras partes del cuerpo. Ejemplos de varios cánceres incluyen pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal,

cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de cerebro, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y similares.

Mediante "proteína quimérica" se refiere a una única unidad de polipéptido que comprende dos dominios de polipéptido distintos, en donde los dos dominios no se presentan de manera natural dentro de la misma unidad de polipéptido. Típicamente, dichas proteínas quiméricas se hacen mediante la expresión de un constructor de cADN pero podrían hacerse mediante métodos de síntesis de proteína conocidos en la técnica.

El término "derivado" según se usa aquí en relación con la secuencia de aminoácido se refiere a la modificación química de una proteína de fusión de la invención.

"Codificar" se refiere a la propiedad inherente de las secuencias específicas de los nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un cADN, o un ARNm, para servir como patrones para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en los procesos biológicos que tienen ya sea una secuencia definida de nucleótidos (es decir, rARN, tARN y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas que resultan de las mismas. De este modo, el gen codifica una proteína si la transcripción y el traslado del ARNm que corresponde con ese gen producen la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena de codificación, cuya secuencia de nucleótido es idéntica a la secuencia del ARNm y se proporciona usualmente

en la lista de secuencias, como la cadena que no codifica, usadas como patrón para la transcripción de un gen de cADN, se pueden referir como las que codifican la proteína u otro producto de ese gen o cADN.

Salvo que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótido que codifica una secuencia de aminoácido" incluye todas las secuencias de nucleótido que son versiones degeneradas de cada una y que incluyen la misma secuencia de aminoácido. Las secuencias de aminoácido que codifican las proteínas y el ARN pueden incluir intrones.

"Cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" se usa aquí de manera intercambiable, y se refiere a una cantidad de un compuesto, formulación, material, o composición, como se describe aquí efectiva para conseguir un resultado biológico particular. Dichos resultados pueden incluir, pero sin limitación, la inhibición de la infección viral según se determina mediante cualquier medio apropiado en la técnica.

Según se usa aquí "endógeno" se refiere a cualquier material a partir de o producido dentro de un organismo, célula, tejido o sistema.

Según se usa aquí, el término "exógeno" se refiere a cualquier material introducido a partir de o producido fuera de un organismo, célula, tejido o sistema.

El término "expresión" según se usa aquí se define como la transcripción y/o traslado de una secuencia de nucleótido particular accionada por su promotor.

"Vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende las secuencias de control de expresión operativamente enlazadas con una secuencia de nucleótido que se va a expresar. Un vector de expresión comprende suficiente elementos en cis para la expresión; otros elementos para expresión pueden ser suministrados por la célula huésped o en un sistema de expresión in vitro. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (por ejemplo desnudos o contenidos en liposomas) y virus (por ejemplo, lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adeno-asociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.

Según se usa aquí, el término "proteína de fusión" se refiere a proteínas quiméricas que comprenden secuencias de aminoácido de dos o más proteínas diferentes. Típicamente, las proteínas de fusión son el resultado de técnicas de recombinación in vitro bien conocidas en la técnica.

"Homólogo" como se usa aquí, se refiere a la identidad secuencia de subunidad entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácido nucleico, tales como, dos moléculas de ADN o dos moléculas de RNA, o entre dos moléculas de polipéptido. Cuando una posición de subunidad en las dos moléculas es ocupada por la misma subunidad

monomérica, por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas; por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias son homólogas, las dos secuencias son 50% homólogas, si 90% de las posiciones (por ejemplo, 9 de 10), son coincidentes u homólogas, las dos secuencias son 90% homólogas.

El término "reacción inmune", según se usa aquí, se refiere al resultado detectable de estimular y/o activar una célula inmune.

"Respuesta inmune", según el término que se usa aquí, se refiere a un proceso que da como resultado la activación y/o invocación de una función efectora en cualquiera de las células T, células B, células asesinas naturales (NK), y/o células que presentan antígeno. De este modo, una respuesta inmune, como lo entendería un experto en la técnica, incluye pero sin limitación, cualquier activación detectable específica de antígeno o alogénica de una respuesta de célula T auxiliares o célula T citotóxica, la producción de anticuerpos, la activación mediada por células T de reacciones alérgicas y similares.

"Célula inmune", según el término que se usa aquí, se refiere a cualquier célula involucrada en el montaje de una

respuesta inmune. Dicha célula incluye, pero sin limitación, células T, células B, células NK, células que presentan antígeno, y similares.

Según se usa aquí, un "material de instrucción" incluye una publicación, una grabación, un diagrama, o cualquier otro medio de expresión que se puede usar para comunicar la utilidad de las composiciones y métodos de la invención. El material de instrucción del kit de la invención puede, por ejemplo ser fijado a un recipiente que contiene el ácido nucleico, el péptido y/o la composición de la invención o ser transportado junto con un recipiente que contiene el ácido nucleico, el péptido y/o la composición. Alternativamente, el material de instrucción puede ser transportado de manera separada del recipiente con la intención de que el material de instrucción y el compuesto se usen de manera cooperativa por el receptor.

"Aislado" se refiere alterado o removido del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido que se presenta de manera natural en un animal vivo no es "aislado", pero el mismo ácido nucleico o péptido parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural es "aislado". Un ácido nucleico o proteína aislado puede existir en una forma sustancialmente purificada, o puede existir en un ambiente no natural tal como, por ejemplo, una célula huésped.

En el contexto de la presente invención, se usan las siguientes abreviaciones para las bases de ácido nucleico que se presentan de manera común. "A" se refiere a adenosina, "C" se refiere a citosina, "G" se refiere a guanosina, "T" se refiere a timidina, y "U" se refiere a uridina.

A menos que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótido que codifica una secuencia de aminoácido" incluye todas las secuencias de nucleótido que son versiones degeneradas una de otra y que codifican la misma secuencia de aminoácido. La frase secuencia de nucleótido que codifica una proteína o un ARN también puede incluir intrones en la medida en que la secuencia de nucleótido que codifica la proteína puede en alguna versión contener un (unos) intrón(es).

Un "lentivirus" según se usa aquí se refiere a un género de la familia Retroviridae. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus en ser capaces de infectar células que no se dividen; pueden suministrar una cantidad significativa de información genética en el ADN de la célula huésped, de modo que son uno de los métodos más eficientes de un vector de suministro de gen. HIV, SIV y FIV son todos ejemplos de lentivirus. Los vectores derivados de lentivirus ofrecen los medios para conseguir niveles significativos de transferencia genética in vivo.

El término "que modula" una respuesta inmune, según se usa aquí, se refiere a mediar un aumento o disminución

detectable en el nivel de una respuesta inmune en un mamífero comparado con el nivel de una respuesta inmune en el mamífero en ausencia de un tratamiento o compuesto, y/o comparado con el nivel de una respuesta inmune en un mamífero de otro modo idéntico pero no tratado. El término comprende perturbar y/o afectar una señal nativa o respuesta mediando de este modo una respuesta terapéutica beneficiosa en un mamífero, preferentemente, un humano.

"Señal negativa", según se usa aquí, se refiere a una señal que induce la cascada típica de eventos intracelulares asociados con entre otras cosas, la disminución de la proliferación, disminución de la activación, disminución del proceso celular, y similares.

"Señal positiva", según se usa aquí, se refiere a una señal que induce la cascada típica de eventos intracelulares asociados con entre otras cosas el aumento de la proliferación, aumento de la activación, aumento del proceso celular, y similares.

El término "unido operativamente" se refiere al enlace funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácido nucleico heteróloga que da como resultado una expresión de este último. Por ejemplo, una primera secuencia de ácido nucleico se une operativamente con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor se une

operativamente con una secuencia de codificación si el promotor afecta la transcripción o expresión de la secuencia de codificación. Por lo general, las secuencias de ADN operativamente unidas son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones que codifican la proteína en el mismo marco de lectura.

La administración "parenteral" de una composición inmunogénica incluye, por ejemplo, inyección subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.), o intraesternal, o técnicas de infusión.

El término "polinucleótido" según se usa aquí se define como una cadena de nucleótidos. Más aún, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. De este modo, los ácidos nucleicos y los polinucleótidos según se usan aquí son intercambiables. Un experto en la técnica tiene el conocimiento general de que los ácidos nucleicos son polinucleótidos, que se pueden hidrolizar en los "nucleótidos" monoméricos. Los nucleótidos monoméricos pueden ser hidrolizados en nucleósidos. Según se usa aquí, los polinucleótidos incluyen, pero sin limitación, todas las secuencias de ácido nucleico que se obtienen mediante cualquier medio disponible en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, medios recombinantes, es decir, la clonación de las secuencias de ácido nucleico a partir de una biblioteca recombinante o un genoma de célula, usando tecnología de clonación común y PCRTM, y similares, y mediante medios sintéticos.

Según se usa aquí, los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable, y se refieren a un compuesto que comprende residuos de aminoácido covalentemente enlazados por enlaces de péptido. Una proteína o péptido tiene que contener por lo menos dos aminoácidos, y no se colocan ninguna limitación en el número máximo de aminoácidos que pueden comprender una secuencia de proteína o de péptido. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces de péptido. Según se usa aquí, el término se refiere tanto a las cadenas cortas, que comúnmente son referidas en la técnica como péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, como a las cadenas más largas, que por lo general están referidas en la técnica como proteínas, de las cuales hay muchos tipos. Los "polipéptidos" incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Los polipéptidos incluyen péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos, o una combinación de los mismos.

El término "promotor" según se usa aquí está definido como una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, requerida para iniciar la transcripción específica de una secuencia de polinucleótido.

Según se usa aquí, el término "promotor/secuencia reguladora" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se requiere para la expresión de un producto del gen operativamente unido con el promotor/secuencia reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser el promotor de núcleo y en otros casos, esta secuencia puede incluir además una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que se requieren para la expresión del producto del gen. El promotor/secuencia reguladora puede ser, por ejemplo, aquella que expresa el producto del gen de una manera específica de tejido.

Un promotor "constitutivo" es una secuencia de nucleótido que, se une operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto de gen, hace que se produzca el producto de gen en una célula bajo la mayoría de o todas las condiciones fisiológicas de la célula.

Un promotor "inducible" es una secuencia de nucleótido que, cuando se une operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto de gen, hace que se produzca el producto de gen en una célula sustancialmente solo cuando un inductor que corresponde con el promotor está presente en la célula.

Un promotor "específico de tejido" es una secuencia de nucleótido que, cuando se une operativamente con un polinucleótido codificado o especificado por un gen, hace que

se produzca el producto de gen en una célula sustancialmente solo si la célula es una célula del tipo de tejido que corresponde con el promotor:

El término "sujeto" está destinado a incluir organismos vivos en los que se puede provocar una respuesta inmune (por ejemplo mamíferos).

Según se usa aquí, una célula "sustancialmente purificada" es una célula que está esencialmente libre de otros tipos de célula. Una célula sustancialmente purificada se refiere además a una célula que ha sido separada de otros tipos de célula que se asocia normalmente en su estado de presentación 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 las células con la que se asocian de manera natural en su estado natural. En algunas modalidades, las células se cultivan *in vitro*. En otras modalidades, las células no se cultivan *in vitro*.

El término "terapéutico" según se usa aquí se refiere a un tratamiento y/o profilaxis. Un efecto terapéutico se obtiene mediante supresión, remisión o erradicación de un estado de enfermedad.

El término "transfectado" o "transformado" o "transducido" según se usa aquí se refiere a un proceso

mediante el cual el ácido nucleico exógeno es transferido o introducido en la célula huésped. Una célula "transfectada" o "transformada" o "transducida" es aquella que ha sido transfectada, transformada o transducida con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula sujeto primaria y su progenie.

La frase "bajo control transcripcional" o "unido operativamente" según se usa aquí significa que el promotor está en la ubicación y orientación correcta en relación con un polinucleótido para controlar la iniciación de la transcripción mediante polimerasa de RNA y la expresión del polinucleótido.

Un "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado que se puede usar para suministrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. Los numerosos vectores son conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfifílicos, plásmidos y virus. De este modo, el término "vector" incluye un plásmido de replicación autónoma o un virus. El término también debe interpretarse para incluir compuestos no plásmidos y no virales que facilitan la transferencia del ácido nucleico en las células, de modo que, por ejemplo, los compuestos de polilisina, liposomas, y similares. Ejemplos de vectores virales incluyen, pero sin limitación, vectores adenoviral, vectores de virus adeno-asociados, vectores retrovirales, y similares.

Mediante el término "estimulación" se refiere a una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimuladora (por ejemplo, un complejo TCR/CD3) con su ligando cognado mediando de este modo un evento de transducción de señal, tal como, pero sin limitación, transducción de señal vía el complejo TCR/CD3. La estimulación puede mediar la expresión alterada de ciertas moléculas, tal como regulación descendente de TGF- β , y/o reorganización de las estructuras de citoesqueleto, y similares.

"Activación", según se usa aquí, se refiere al estado de una célula T que ha sido suficientemente estimulada para inducir la proliferación celular detectable. La activación también se puede asociar con una producción de citoquina inducida, y funciones efectoras detectables. El término "células T activadas" se refiere, entre otras cosas, a las células que experimentan división celular. La activación también se puede asociar con la generación de una respuesta inmune (por ejemplo, un mitógeno tal como ConA o PHA), marcadores de superficie detectablemente regulados en forma ascendente, tales como CD25, es decir, el receptor IL2, inicia una cascada de fosforilación que comprende p56lck, origina la liberación de citoquinas e interleucinas, aumenta la síntesis del ADN la cual puede evaluarse, entre otros métodos, evaluando el nivel de incorporación de ^3H .timidina en hebras de ADN nacientes, y origina que proliferen las células.

El término "se une específicamente", según se usa aquí, se refiere a un anticuerpo, o ligando, que reconoce y se une con una pareja de unión cognado (por ejemplo, una molécula estimuladora y/o co-estimuladora presente en una célula T) presente en una muestra, pero cuyo anticuerpo o ligando no reconoce sustancialmente o se une a otras moléculas en la muestra.

Rangos; en toda esta divulgación, se pueden presentar varios aspectos de la invención en un formato de rango. Deberá entenderse que la descripción en un formato de rango es simplemente por conveniencia y brevedad y no deberá interpretarse como una imitación inflexible en el ámbito de la invención. En consecuencia, la descripción de un rango deberá considerarse que ha divulgado específicamente todos subrangos posibles así como los valores numéricos individuales dentro de ese rango. Por ejemplo, la descripción de un rango tal como 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., así como los números individuales dentro de ese rango, por ejemplo, 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del rango.

Descripción

La presente invención se refiere al descubrimiento de que un receptor quimérico de cambio puede ser diseñado para cambiar una señal de transducción de señal negativa en una señal positiva. En una modalidad, el receptor de cambio es una proteína quimérica que comprende una primera proteína o fragmento de la misma asociada con una señal negativa y una segunda proteína o fragmento de la misma asociada con una señal positiva. Un ejemplo de proteína asociada con una señal negativa incluye pero sin limitación CTLA-4, PD-1, BTLA, y similares. Un ejemplo de una proteína asociada con una señal positiva incluye pero sin limitación CD28, ICOS, y similares.

La invención se refiere a receptores de cambio quiméricos y las proteínas de fusión relacionadas, y a los métodos para tratar el cáncer con estas proteínas.

En una modalidad, la invención proporciona una célula (por ejemplo, célula T o célula asesina natural) diseñada para expresar un receptor de cambio quimérico en donde la célula diseñada presenta una propiedad antitumoral. En algunos casos, la célula diseñada también está diseñada para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunos casos, la célula diseñada de la invención presenta una producción mejorada de IL-2 e IFN- γ . En algunos casos, la célula diseñada de la invención está polarizada para secretar IL-17. Por lo tanto, la célula diseñada de la invención

cuando se infunde en un paciente puede eliminar las células tumorales *in vivo* en el paciente.

Composiciones

La presente invención proporciona, en un aspecto, un receptor de cambio que cuando se expresa en una célula convierte una señal negativa en una señal positiva en la célula. Por ejemplo, este receptor de cambio tiene un primer dominio que comprende un polipéptido que suministra una señal negativa; y un segundo dominio que comprende un polipéptido que suministra una señal positiva.

En una modalidad, un polipéptido que tiene la capacidad de suministrar una señal negativa incluye pero sin limitación CTLA4 PD-1, BTLA, y similares.

En una modalidad, un polipéptido que tiene la capacidad de suministrar una señal positiva incluye pero sin limitación ICOS, CD28, y similares.

Los primeros dominios apropiados en el contexto de un polipéptido que suministra una señal negativa incluyen variantes o derivados de CTLA4 de tipo natural. Preferentemente, el primer dominio del receptor de esta modalidad es por lo menos una porción del dominio extracelular de la proteína CTLA, específicamente esa porción del dominio extracelular que es necesaria para la unión al ligando natural de CTLA. Las variantes de tipo natural del

dominio extracelular, o la porción del dominio extracelular responsable de la unión con el ligando natural de CTLA, también se incluyen en la presente invención, con tal que la variante proporcione un nivel similar de actividad biológica como la proteína de tipo natural.

Los primeros dominios apropiados en el contexto de un polipéptido que suministra una señal negativa incluyen variantes o derivados de PD-1 de tipo natural. Preferentemente, el primer dominio del receptor de cambio de esta modalidad es por lo menos una porción del dominio extracelular de la proteína PD-1, específicamente aquella proteína del dominio extracelular que es necesaria para la unión con el ligando natural de PD-1. Las variantes de tipo natural del dominio extracelular, o la porción del dominio extracelular responsable de la unión con el ligando natural de PD-1 también se incluyen en la presente invención, con tal que la variante proporcione un nivel similar de actividad biológica como la proteína de tipo natural.

Los primeros dominios apropiados en el contexto de un polipéptido que suministra una señal negativa incluyen variantes o derivados de BTLA de tipo natural. Preferentemente, el primer dominio del receptor de cambio de esta modalidad es por lo menos una porción del dominio extracelular de la proteína BTLA, específicamente aquella porción del dominio extracelular que es necesaria para la unión con el ligando natural de BTLA. Las variantes de tipo natural del dominio extracelular, o la porción del dominio

extracelular responsable para la unión con el ligando natural de BTLA, también están incluidas en la presente invención, con tal que la variante proporcione un nivel similar de actividad biológica como la proteína de tipo natural.

Los segundos dominios apropiados en el contexto de un polipéptido que suministra una señal positiva incluyen variantes o derivados de la proteína ICOS. Preferentemente, el segundo dominio del receptor de cambio en esta modalidad es por lo menos una porción del dominio intracelular (también referido como un endodominio) de la proteína ICOS, específicamente aquella proteína que es necesaria para activar una señal con los componentes intracelulares de la celular. Las variantes de tipo natural del dominio intracelular de la proteína ICOS, del dominio intracelular de la proteína ICOS, o la porción del dominio intracelular responsable de la señalización, también se incluyen en la presente invención, con tal que la variante proporcione un nivel similar de actividad biológica que la proteína de tipo natural.

Los segundos dominios apropiados en el contexto de un polipéptido que suministra una señal positiva incluyen variantes o derivados de la proteína CD28. Preferentemente, el segundo dominio del receptor de cambio en esta modalidad es por lo menos una porción del dominio intracelular (también referido como endodominio o citoplásmico) de la proteína CD28, específicamente aquella proteína que es necesaria para la activación de una señal a los componentes intracelulares

de la célula. Las variantes de tipo natural del dominio intracelular de la proteína CD28, o la porción del dominio intracelular responsable de la señalización, también se incluyen en la presente invención, con tal que la variante proporcione un nivel similar de actividad biológica a la proteína de tipo natural.

El receptor de cambio de la invención comprende un polipéptido que corresponde a un dominio citoplásmico, de transmembrana y extracelular, así como polipéptidos que corresponden a porciones más pequeñas del dominio citoplásmico, de transmembrana y extracelular. En una modalidad, el receptor de cambio comprende el dominio de transmembrana del primer polipéptido que suministra una señal negativa. En otra modalidad, el receptor de cambio comprende el dominio de transmembrana del segundo polipéptido que suministra una señal positiva.

En incluso otro aspecto de la presente invención, el primer polipéptido que suministra un componente de señal negativa de cualquiera de los receptores de cambio aquí descritos puede ser sustituido con otra proteína inhibidora, es decir, una proteína que evita la activación de una respuesta inmune y o induce la apoptosis en las células T u otros tipos de célula, tales como las células B, células asesinas naturales (NK), células NKT, células progenitoras linfoides, células dendríticas, monocitos macrófagos, células de linaje de macrófago basado en tejido con capacidad que presenta antígeno, y cualquiera de un número de células no

profesionales que presentan un antígeno, por ejemplo, células endoteliales. Ejemplos de proteínas inhibidoras incluyen, pero sin limitación, ligandos a PD-1, CTLA-4, BTLA, CD160, CD161 y CD94; LAG-3, y CD244 (ver 2011, Wherry, Nat Immunol. 131:492-9).

Cualquier primer polipéptido apropiado que suministra una señal negativa se puede usar de acuerdo con la presente invención, siempre que el polipéptido se una con el correspondiente ligando, y mediante esta unión el evento conlleva a una activación del receptor de cambio. De acuerdo con una modalidad de la presente invención, el compromiso del primer polipéptido que suministra una señal negativa del receptor de cambio con su correspondiente ligando da como resultado la activación del segundo polipéptido que suministra una señal positiva del receptor de cambio. De esta manera, una señal negativa puede convertirse en una señal positiva. Esto es, el primer polipéptido del receptor de cambio de la presente invención puede activar una vía de señalización intracelular, mediante lo cual la activación del segundo polipéptido de la invención da como resultado la conversión de la señal negativa en una señal positiva. De este modo, una única característica del primer polipéptido del receptor de cambio de la presente invención es que esta convierte la señal trans natural que daría como resultado de manera natural una señal negativa a la célula en una señal positiva que induce la célula a presentar características antitumorales.

De manera similar, se puede usar cualquier segundo polipéptido apropiado, siempre que la proteína pueda enviar una señal positiva a una célula, que sea distinta de la señal trans asociada con el primer componente polipéptido del receptor de cambio. El segundo polipéptido puede ser una proteína que envía una señal positiva o una señal de activación. Un ejemplo preferido del segundo polipéptido de la invención incluye pero sin limitación CD28, CD27, ICOS, CD137 (4-1BB), y TCRzeta.

En una modalidad, la invención aprovecha los microambientes donde hay un gran número de ligandos o proteínas que inhiben el sistema inmune en donde la inhibición del sistema inmune da como resultado un estado de enfermedad no deseado. Esto es, el receptor de cambio puede ser diseñado para comprender un primer dominio que se une con el factor inhibidor inmune en el microambiente y convierte la señal naturalmente asociada con el factor inhibidor inmune en una señal positiva donde la señal positiva activa la célula para exhibir una respuesta inmune potenciada.

Una proteína quimérica preferida de la presente invención es BTLA:ICOS. La quimerización genética de BTLA con secuencias ICOS y expresión recombinante da como resultado un "receptor de cambio" BTLA:ICOS quimérico que demuestra las características estructurales y funcionales atribuibles tanto a BTLA como ICOS. Las células diseñadas para expresar BTLA:ICOS pueden redirigir la señalización inhibidora a la señal estimuladora y mejorar de este modo la función de la célula T. En algunos casos, las células son

diseñadas para expresar el receptor de cambio BTLA:ICOS en combinación con CAR.

Otra proteína quimérica preferida de la presente invención es PD1:CD28. La quimerización genética de PD1 con las secuencias CD28 y la expresión recombinante da como resultado el "receptor de cambio" quimérico PD1:CD28 que demuestra las características estructurales y funcionales atribuibles tanto a PD1 como CD28. Las células diseñadas para expresar PD1:CD28 pueden redirigir la señalización inhibidora a la señal estimuladora y mejorar de este modo la función de la célula T. En algunos casos, las células son diseñadas para expresar el receptor de cambio PD1:CD28 en combinación con CAR.

Otra proteína quimérica preferida de la presente invención es CTLA4:CD28. La quimerización genética de CTLA4 con las secuencias CD28 y la expresión recombinante da como resultado el "receptor de cambio" quimérico CTLA4:CD28 que demuestra las características estructurales y funcionales atribuibles tanto a CTLA4 como CD28. Las células diseñadas para expresar CTLA4:CD28 pueden redirigir la señal inhibidora a la señal estimuladora y mejorar de este modo la función de la célula T. En algunos casos, las células son diseñadas para expresar el receptor de cambio CTAL4:CD28 en combinación con CAR.

Las proteínas presentes pueden existir en numerosas formas. Por ejemplo, las proteínas presentes pueden estar en

forma de un polipéptido lineal o ramificado. Las proteínas quiméricas lineales se pueden producir mediante tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, los casetes de transcripción quimérica se pueden ensamblar usando una superposición de sitio de restricción de endonucleasa o la extensión de empalme mediante superposición basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las proteínas quiméricas de polipéptido ramificado se pueden producir fácilmente mediante tecnología de péptido sintético ensamblado con un patrón (TASP) (Mutter, Trends Biochem Sci. 13:260-265 (1988)). Mediante este proceso, las unidades de péptido se sintetizan separadamente y se acoplan covalentemente con un portador multifuncional, tal como un péptido de núcleo, usando reactivos de acoplamiento químico. Por ejemplo, un análogo de decapeptido cíclico de gramicidina S, en el que dos segmentos de láminas beta antiparalelas (lys-ala-lys) se enlazan mediante dos giros beta, se puede usar como un péptido de núcleo. Las estrategias de condensación de segmento se pueden usar para unir la primera y segunda proteínas con los grupos épsilon-amino de 4 cadenas laterales de lisina.

Las proteínas presentes también pueden existir como dos o más proteínas separadas enlazadas entre sí mediante un puente, tal como un enlace químico. Por ejemplo, dos o más componentes de proteína se pueden enlazar covalentemente en forma directa entre sí en estructuras ramificadas usando reactivos químicos de reticulación tal como ditio-

bis)succinimidil proprionato) (DSP). Mediante esta metodología, por ejemplo, la primera y segunda proteínas se pueden enlazar directamente.

Los primero y segundo polipéptidos particulares del receptor de cambio quimérico de la invención pueden variar dependiendo de la enfermedad que se va a tratar. Típicamente, por ejemplo, cuando se trata el cáncer o las infecciones virales, se usan los segundos polipéptidos que estimulan las respuestas de célula inmune. Cuando se trata trastornos del sistema inmune donde existen respuestas inmunes patogénicas, se usa un segundo polipéptido inhibidor. De este modo, para el cáncer y las enfermedades virales, se desean los receptores de cambio que convierten las señales de activación inmune de inhibición a activación. En contraste, para las enfermedades autoinmunes, se desean los receptores de cambio quiméricos que convierten la activación en inhibición las señales inmunes. En esta configuración, el segundo componente de proteína inmune-inhibidor puede ser dirigido a diferentes efectores inmunes patogénicos, incluyendo células T, células B, células asesinas naturales y células que presentan antígeno.

En consecuencia, la invención proporciona un receptor de cambio que cuando se expresa en una célula convierte una señal positiva en una señal negativa en la célula. Por ejemplo, este receptor de cambio contiene un primer dominio que comprende un polipéptido que suministra una señal

positiva; y un segundo dominio que comprende un polipéptido que suministra una señal negativa en la célula.

Modificaciones Genéticas

La presente invención comprende una célula (por ejemplo, célula T) transducida con un vector lentviral (LV). En una modalidad, el LV codifica el receptor de cambio de la invención que comprende un primer dominio que comprende un polipéptido que suministra una señal negativa y un segundo dominio que comprende un polipéptido que suministra una señal positiva.

En una modalidad, la célula puede ser además transfectada con un LV que codifica un receptor quimérico de antígeno (CAR) que combina un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico con un dominio intracelular de la cadena CD3-zeta o la proteína FcγRI en una única proteína quimérica.

Los vectores derivados de los retrovirus tales como el lentovirus son herramientas apropiadas para conseguir una transferencia genética de largo plazo ya que permiten la integración estable de largo plazo de un transgén y su propagación en las células hijas. Los vectores lentivirales tienen la ventaja añadida sobre los vectores derivados de onco-retrovirus tal como los virus de leucemia murina en que pueden transducir células no proliferativas, tales como

hepatocitos. Tienen además la ventaja adicional de una baja inmunogenicidad.

En un breve resumen, la expresión de los ácidos nucleicos naturales o sintéticos de la invención se consigue típicamente enlazando operativamente un ácido nucleico que codifica el polipéptido deseado o las porciones del mismo con un promotor, y que incorpora el constructo en un vector de expresión. Los vectores pueden ser apropiados para replicación e integración de las eucariotas. Los típicos vectores de clonación contienen terminadores de transcripción y traslado, secuencias de iniciación, y los promotores útiles para la regulación de la expresión de la secuencia de ácido nucleico deseada.

El ácido nucleico se puede clonar en un número de tipos de vectores. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede clonar en un vector que incluye, pero sin limitación un plásmido, un fagémido, un derivado de fago, un virus de animal y un cósmido. Los vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sonda y vectores de secuenciación.

Además, el vector de expresión puede proporcionarse a una célula en forma de un vector viral. La tecnología del vector viral es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volúmenes 1-3 (3era. Ed., Cold Spring Harbor Press, NY 2001), y en otros manuales de virología y

biología molecular. Los virus, que son útiles como vectores incluyen, pero sin limitación, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus del herpes y lentivirus. En general, un vector apropiado que contiene un origen de replicación funcional en por lo menos un organismo, una secuencia promotora, sitios convenientes de endonucleasa + de restricción, y uno o más marcadores seleccionables, (por ejemplo, WO 01/96584, WO 01/29058 y Patente Estadounidense No. 6,326,193).

Los elementos promotores adicionales, por ejemplo, potenciadores, regulan la frecuencia de iniciación transcripcional. Típicamente, estos se localizan en la región 30-110 bp corriente arriba del sitio de inicio, aunque se ha demostrado recientemente que un número de promotores contienen elementos funcionales corriente abajo del sitio de inicio también. La separación entre los elemento promotores es frecuentemente flexible, de modo que la función promotora se conserva cuando los elementos se invierten o mueven relativamente uno hacia el otro. En el promotor de timidina quinasa (tk), la separación entre los elementos promotores puede ser incrementada a 50 bp aparte antes de que la actividad comience a declinar. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar ya sea cooperativa o independientemente para activar la transcripción.

Un ejemplo de un promotor es la secuencia promotora de citomegalovirus temprano inmediato (CMV). Esta secuencia

promotora es una secuencia promotora constitutiva fuerte capaz de conducir altos niveles de expresión de cualquier secuencia de polinucleótido operativamente unida a la misma. Sin embargo, otras secuencias promotoras constitutivas también se pueden usar, incluyendo, pero sin limitación promotor temprano de virus de simio 40 (SV40), virus de tumor mamario de ratón (MMTV), promotor de repetición de terminal largo (LTR) del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), promotor MoMuLV, un promotor de virus de leucemia aviar, un promotor temprano inmediato del virus Epstein-Barr, un promotor del virus del sarcoma de Rous, así como promotores del gen humano tal como, pero sin limitación, el promotor de la actina, el promotor de la miosina, el promotor de la hemoglobina, y el promotor de la creatina quinasa. Además, la invención no deberá limitarse al uso de promotores constitutivos. Los promotores inducibles también son contemplados como parte de la invención. El uso de un promotor inducible proporciona un cambio molecular capaz de conectar la expresión de la secuencia de polinucleótido que está operativamente unida cuando dicha expresión es deseada, o apagar la expresión cuando la expresión no es deseada. Ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero sin limitación, un promotor de metalotionina, un promotor de glucocorticoides, un promotor de progesterona, y un promotor de tetraciclina.

Para evaluar la expresión de un polipéptido CAE o porciones del mismo, el vector de expresión que se va a introducir en una célula también puede contener ya sea un gen

marcador seleccionable o un gen reportero o ambos para facilitar la identificación y la selección de las células de expresión de la población de células que se busca transfectar o infectar mediante vectores virales. En otros aspectos, el marcador seleccionable puede realizarse en una pieza separada de ADN y se usa en un procedimiento de co-transfección. Ambos marcadores seleccionables y genes reporteros pueden ser flanqueados con secuencias reguladoras apropiadas para permitir la expresión en las células huésped. Los marcadores seleccionables útiles incluyen, por ejemplo, genes resistentes al antibiótico, tales como neo y similares.

Los genes reporteros se usan para identificar las células potencialmente transfectadas y para evaluar la funcionalidad de las secuencias reguladoras. En general, un gen reportero es un gen que no está presente en o se expresa mediante el organismo recipiente o tejido y que codifica un polipéptido cuya expresión se manifiesta mediante cierta propiedad fácilmente detectable, por ejemplo, actividad enzimática. La expresión del gen reportero es examinada en un momento apropiado después que el ADN ha sido introducido en las células receptoras. Los genes reporteros apropiados pueden incluir genes que codifican la luciferasa, la beta-galactosidasa, la cloranfenicol acetiltransferasa, la fosfatasa alcalina secretada, o el gen de la proteína fluorescente verde (por ejemplo, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Los sistemas de expresión apropiados son bien conocidos y se pueden preparar usando técnicas conocidas u obtenerse comercialmente. En general, el

construido con la mínima región de acompañamiento 5' que muestra el nivel más alto de expresión de un gen reportero es identificado como el promotor. Dichas regiones promotoras pueden unirse a un gen reportero y usarse para evaluar la capacidad de los agentes para modular la transcripción accionada por un promotor.

Los métodos para introducir y expresar genes en una célula son bien conocidos en la técnica. En el contexto de un vector de expresión, el vector puede introducirse fácilmente en una célula huésped, por ejemplo, en una célula de mamífero, bacteriana, de levadura o de insecto mediante cualquier método en la técnica. Por ejemplo, el vector de expresión puede ser transferido a una célula huésped mediante medios físicos, químicos o biológicos.

Los métodos físicos para introducir un polinucleótido en una célula huésped incluyen precipitación de fosfato de calcio, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación y similares. Los métodos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleico exógeno son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL volúmenes 1-3 (3era. ed., Cold Spring Harbor Press, NY 2001).

Los métodos biológicos para introducir un polinucleótido de interés en una célula huésped incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores virales, y especialmente los vectores retrovirales, se han convertido en los métodos más

ampliamente usados para insertar genes en células de mamífero, por ejemplo, humanas. Otros vectores virales pueden derivarse de lentivirus, poxvirus, virus I del herpes simple, adenovirus y virus adeno-asociados y similares. Ver, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses Nos. 5,35,674 y 5,585,362.

Los medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula huésped incluyen sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromolécula, nanocápsulas, microesferas, perlas, y sistemas basados en lípidos incluyendo emulsiones aceite-en-agua, micelas, micelas mezcladas y liposomas. Un sistema coloidal ejemplar para usar como un vehículo de suministro in vitro e in vivo es un liposoma (por ejemplo, una vesícula de membrana artificial).

En el caso cuando un sistema de suministro no viral se utiliza, un vehículo de suministro ejemplar es un liposoma. El uso de formulaciones de lípido es contemplado para la introducción de los ácidos nucleico en una célula huésped (in vitro, ex vivo o in vivo). En otro aspecto, el ácido nucleico puede estar asociado con un lípido. El ácido nucleico asociado con un lípido puede ser encapsulado en el interior acuoso de un liposoma, intercalado en una bicapa de lípido o un liposoma, unido a un liposoma vía una molécula de enlace que está asociada tanto con el liposoma como con el oligonucleótido, atrapado en un liposoma, formado como complejo con un liposoma, dispersado en una solución que contiene un lípido, mezclado con un lípido, combinado con un

lípidos, contenido en forma de una suspensión en un lípido, contenido o formado como un complejo con una micela, o de lo contrario asociado con un lípido. Las composiciones asociadas con el lípido, el ADN de lípido o el vector de expresión de lípido no se limitan a cualquier estructura particular en solución. Por ejemplo, pueden estar presentes en una estructura de bicapa, como micelas, o con una estructura "colapsada". Pueden estar simplemente intercaladas en una solución, formando posiblemente agregados que no son uniformes de tamaño o forma. Los lípidos son sustancias grasas que pueden ser lípidos que se presentan de manera natural o sintética. Por ejemplo, los lípidos incluyen gotitas de grasa que se presentan de manera natural en el citoplasma así como la clase de compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados, tales como ácidos grasos, alcoholes, aminas, aminoalcoholes, y aldehídos.

Los lípidos apropiados para usar se pueden obtener a partir de vectores comerciales. Por ejemplo, dimiristil fosfatidilcolina ("DMPC") se puede obtener de Sigma, St. Louis, MO; dicetil fosfato ("DCP") se puede obtener de K & K Laboratories (Plainview, NY); colesterol ("Choi") se puede obtener de Calbiochem-Behring; dimiristil fosfatidilglicerol ("DMPG") y otros lípidos se pueden obtener de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL.). Las soluciones stock de los lípidos en cloroformo o cloroformo/metanol se pueden almacenar a aproximadamente -20°C. El cloroformo se usa aquí como el único solvente puesto que se evapora más fácilmente

que el metanol. El "liposoma" es un término genérico que comprende una variedad de vehículos de lípido simples y multilaminares formados por la generación de bicapas de lípido o agregados. Los liposomas se pueden caracterizar por tener estructuras vesiculares con una membrana de bicapa de fosfolípido y un medio acuoso interior. Los liposomas multilaminares tienen múltiples capas de lípido separadas por un medio acuoso. Estas se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos son suspendidos en un exceso de solución acuosa. Los componentes de lípido experimentan un auto-reordenamiento antes de la formación de las estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas de lípido (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10). Sin embargo, las composiciones que tienen diferentes estructuras en la solución que la estructura vesicular normal también son comprendidas. Por ejemplo, los lípidos pueden asumir una estructura micelar o simplemente existir como agregados no uniformes de moléculas de lípido. También se contemplan los complejos de ácido lipofectamina-nucleico.

Aplicaciones Terapéuticas

La presente invención incluye un tipo de terapia celular en donde las células T son genéticamente modificadas para expresar un receptor de cambio y la célula T diseñada es infundida a un receptor que lo necesita. La célula infundida es capaz de matar las células tumorales en el receptor. A diferencia de las terapias de anticuerpo, las células T diseñadas de la invención son capaces de replicarse *in vivo*

dando como resultado una persistencia de largo plazo que puede conllevar a un control tumoral sostenido.

La presente invención también está dirigida a métodos para tratar un paciente con una enfermedad que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de los receptores de cambio diseñados de la presente invención. Varias enfermedades pueden ser tratadas de acuerdo con los presentes métodos, incluyendo pero sin limitación, cáncer, tal como carcinoma de ovario, carcinoma de mama, carcinoma de colon, glioblastoma multiforme, carcinoma de próstata y leucemia, infecciones virales, tales como infecciones virales crónicas con HBV, HCV, HTLV-1, HTLV-II, EBV, HSV-I, HSV-II, y KSHV; y enfermedades autoinmunes, tales como artritis, asma, enfermedad de injerto-versus-huésped, rechazo de órgano, psoriasis, eritematosis de lupus sistémico, alergia atópica, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple, dermatitis alérgica, síndrome de Sjogren, esclerosis sistémica progresiva, tiroiditis autoinmune, diabetes autoinmune, enfermedades autoinmunes del hígado, síndromes de médula ósea mielodisplásica.

Ejemplos de cáncer incluyen pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y lentivirus o malignidades linfoides. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de riñón o renal, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón,

cáncer de célula escamosa (por ejemplo, cáncer de célula escamosa epitelial), cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye cáncer gastrointestinal, tumores del estroma gastrointestinal (GIST), cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, glioblastoma, retinoblastoma, astrocitoma, tecomas, arrenoblastomas, hepatoma, malignidades hematológicas que incluyen linfoma no Hodgkins (NHL), mieloma múltiple y malignidades hematológicas agudas, carcinoma endometrial o uterino, endometriosis, fibrosarcomas, coriocarcinoma, carcinoma de la glándula salival, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinomas esofágicos, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, carcinoma nasofaringeal, carcinomas laringeal, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinomas de piel, Schwannoma, oligodendroglioma, neuroblastomas, rabdomiosarcoma, sarcoma osteogénico, leiomiosarcomas, carcinomas del tracto urinario, carcinomas de tiroides, tumor de Wilm, así como linfoma de célula B (incluyendo linfoma de bajo grado folicular no Hodgkin (NHL); linfocitos pequeños (SL) NHL; NHL de grado intermedio/folicular; NHL difusa de grado intermedio; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL linfoblástico de alto grado; NHL de célula no escindida pequeña de alto grado; NHL enfermedad voluminosa; linfoma de célula del manto; linfoma relacionado con el SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células pilosas, leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo

postransplante (PTLD), así como proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales), y síndrome de Meigs. "Tumor", según se usa aquí, se refiere a todo el crecimiento celular neoplásico, ya sea maligno o benigno, y todas las células precancerosas y cancerosas y tejidos.

En el contexto de la presente invención, "antígeno tumoral" o "antígeno de trastorno hiperproliferativo" o "antígeno asociado con un trastorno hiperproliferativo" se refiere a antígenos que son comunes a los trastornos hiperproliferativos. En ciertos aspectos, los antígenos de trastorno hiperproliferativo de la presente invención se derivan de cánceres que incluyen pero sin limitación melanoma primario o metastásico, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemias, cáncer uterino, cáncer cervical, cáncer de vejiga, cáncer de riñón y adenocarcinomas tales como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, y similares.

En una modalidad, el antígeno tumoral de la presente invención comprende uno o más epítomos de cáncer antigénico inmunológicamente reconocidos como linfocitos de infiltración tumoral (TIL) derivados de un tumor de cáncer de un mamífero.

Los tumores malignos expresan un número de proteínas que pueden servir como antígenos diana para un ataque inmune. Estas moléculas incluyen pero sin limitación antígenos

específicos de tejido tales como MART-1, tirosinasa y GP 100 en melanoma y fosfatasa ácida prostática (PAP) y antígeno específico de próstata (PSA) en cáncer de próstata. Otras moléculas diana pertenecen al grupo de moléculas relacionadas con la transformación tales como el oncogén HER-2/Neu/ErbB-2. Incluso otro grupo de antígenos diana son antígenos onco-fetales tales como antígeno carcinoembrionario (CEA). En el linfoma de célula B la inmunoglobulina de idiotipo específico tumoral constituye un antígeno de inmunoglobulina verdaderamente específico tumoral que es único para el tumor individual. Los antígenos de diferenciación de célula B tales como CD19, CD20 y CD37 son otros candidatos para los antígenos diana en el linfoma de célula B. Algunos de estos antígenos (CEA, HER-2, CD 19, CD20, idiotipo) se han usado como dianas para inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales con limitado éxito.

En el contexto del tratamiento del cáncer, los receptores de cambio de la presente invención pueden ser administrados opcionalmente a un paciente en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos apropiados incluyen, por ejemplo, agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclosfosfamida, alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenomelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosfaoramida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno tales como

clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de la purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-suprarrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; relleno de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glucósido, ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elformitina;

acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinan; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina, ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK TM; razoxano; sizofiran; espirogermanio, ácido tenuazónico; triaziquona; 2, 2', 2''-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por ejemplo, paclitaxel (TaxolTM, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y docetaxel (TaxotereTM, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucil; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como el cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino, etopósido (VP- 16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; teniposide; daunomicina; aminopterín; xeloda; ibandronato, CPT-11, inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas, capecitabina, y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

También se incluyen agentes antitumorales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en los tumores tal como los anti-estrógenos que incluyen por ejemplo tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben la aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida,

goserelina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

También se incluyen agentes quimioterapéuticos que son capaces de percibir las células tumorales a TRAIL y superar la resistencia a TRAIL, tal como inhibidores de proteasoma e inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC), cicloheximida, mesilato de imatinib y otros inhibidores de la proteína tirosina quinasa, 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina, trióxido de arsénico e inhibidores enlazados con X de antagonistas de molécula pequeña de Proteína de Apoptosis; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

La información adicional sobre los métodos para el tratamiento del cáncer se proporciona en la Patente Estadounidense No. 7,285,522, incorporada aquí como referencia en su totalidad.

En consecuencia, en una modalidad preferida, los receptores de cambio de la presente invención pueden ser usados para tratar cáncer de mama. En otra modalidad preferida, los receptores de cambio de la invención se pueden usar para tratar cáncer de colon. En otra modalidad, los receptores de cambio de la invención se pueden usar para tratar cáncer de hígado. En otra modalidad preferida, los receptores de cambio de la invención se pueden usar para tratar cáncer de ovario. En otra modalidad, los receptores de cambio de la invención se pueden usar para tratar

leucemia. En otra modalidad, los receptores de cambio de la invención se pueden usar para tratar melanoma. En modalidades adicionales, los receptores de cambio de la presente invención se pueden usar para tratar enfermedades aloinmunes, por ejemplo rechazo al injerto, o enfermedad de injerto-versus-huésped o huésped-versus-injerto.

Típicamente, para cada aplicación de enfermedad, una pequeña "biblioteca" de receptores de cambio candidatos se puede generar y evaluar comparativamente en modelos ex vivo e in vivo apropiados y bien establecidos para determinar las eficacias relativas y toxicidades.

Las primera y segunda proteínas particulares usadas en los métodos variarán dependiendo de la enfermedad que se va a tratar. Por lo general, para el cáncer, se desean los receptores de cambio que convierten las señales de trans-activación inmune de inhibidora a activadora. Sin ánimo de limitarse por cualquier teoría particular, la respuesta de inmunidad antitumoral provocada por la célula diseñada de la invención puede ser una respuesta inmune activa o pasiva. La respuesta puede ser parte de un planteamiento de inmunoterapia adoptiva.

Con respecto a la inmunización ex vivo, por lo menos uno de los siguientes se presenta in vitro antes de administrar la célula a un mamífero: i) expansión de las células, ii) introducción de un ácido nucleico que codifica un receptor de

cambio de la invención en las células o iii) crioconservación de las células.

Los procedimientos ex vivo son bien conocidos en la técnica y se discuten de manera más completa a continuación. En resumen, las células son aisladas de un mamífero (preferentemente un humano) y se modifican genéticamente (es decir, se transducen o transfectan in vitro) con un vector que expresa un receptor de cambio de la invención. Las células diseñadas pueden ser administradas a un receptor mamífero para proporcionar un beneficio terapéutico. El receptor mamífero puede ser un humano y la célula diseñada puede ser autóloga con respecto al receptor. Alternativamente, las células pueden ser alogénicas, singénicas o xenogénicas con respecto al receptor.

El procedimiento para la expansión ex vivo del vástago hematopoyético y las células progenitoras se describen en la Patente Estadounidense No. 5,199,942, incorporada aquí como referencia, se puede aplicar a las células de la presente invención. Otros métodos apropiados son conocidos en la técnica, por lo tanto la presente invención no está limitada a ningún método particular de expansión ex vivo de las células. En resumen, el cultivo ex vivo y la expansión de las células T comprenden: (1) recolectar el vástago hematopoyético CD34+ y las células progenitoras de un mamífero de la cosecha de sangre periférica o explantes de la médula espinal; y (2) expandir dichas células ex vivo. Además de los factores de crecimiento celular descritos en la

Patente Estadounidense No. 5,199,942, se pueden usar otros factores tales como flt3-L, IL-1, IL-3 y ligando c-kit para el cultivo y la expansión de las células.

Además de usar una vacuna basada en células en términos de inmunización ex vivo, la presente invención proporciona además composiciones y métodos para la inmunización in vivo para provocar una respuesta inmune dirigida contra un antígeno en un paciente.

Por lo general, las células activadas y expandidas como se describen aquí pueden ser utilizadas en el tratamiento y la prevención de enfermedades que surgen en individuos que están inmunocomprometidos. En particular, las células diseñadas de la invención se usan en el tratamiento del cáncer. En ciertas modalidades, las células de la invención se usan en el tratamiento de pacientes con riesgo de desarrollar cáncer. De este modo, la presente invención proporciona métodos para el tratamiento o la prevención del cáncer que comprende administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente efectiva de las células T diseñadas de la invención.

Las células T diseñadas de la presente invención pueden administrarse ya sea solas, o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes tales como IL-2 u otras citoquinas o poblaciones celulares. En resumen, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender una población de célula

diana como se describe aquí, en combinación con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada de fosfato y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente invención se formulan preferentemente para administración intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de una manera apropiada a la enfermedad que se va a tratar (o prevenir). La cantidad y la frecuencia de administración serán determinadas mediante dichos factores según sea la condición del paciente, y el tipo y gravedad de la enfermedad del paciente, aunque las dosificaciones apropiadas se pueden determinar mediante ensayos clínicos.

Cuando "una cantidad inmunológicamente efectiva", "una cantidad antitumoral efectiva", "una cantidad efectiva que inhibe el tumor" o "cantidad terapéutica" está indicada, la cantidad precisa de las composiciones de la presente invención que se va a administrar puede ser determinada por un médico con consideración de las diferencias individuales de la edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis y condición del paciente (sujeto). Se puede

establecer por lo general que una composición farmacéutica que comprende las células T aquí descritas se puede administrar a una dosificación de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, preferentemente 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores enteros dentro de esos rangos. Las composiciones de célula T también se pueden administrar varias veces en estas dosificaciones. Las células se pueden administrar usando técnicas de infusión que son comúnmente conocidas en inmunoterapia (ver, por ejemplo, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 3319:1676, 1988). La dosificación óptima y el régimen de tratamiento para un paciente particular pueden ser determinados fácilmente por un experto en la técnica de la medicina monitoreando al paciente sobre los signos de la enfermedad y regulando el tratamiento en consecuencia.

En ciertas modalidades, puede ser conveniente administrar células T activadas y luego posteriormente volver a extraer sangre (o realizar una aféresis), activar desde allí las células T de acuerdo con la presente invención, y volver a infundir al paciente estas células T activadas y expandidas. Este proceso puede realizarse múltiples veces cada pocas semanas. En ciertas modalidades, las células T pueden ser activadas a partir de extracciones de sangre de 10cc a 400cc. En ciertas modalidades, las células T son activadas a partir de extracciones de sangre de 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80 cc 90cc o 100cc. Sin limitarse por la teoría, usar este tipo de extracción

sanguínea/protocolo de reinfusión múltiple, se puede seleccionar ciertas poblaciones de células T.

La administración de las composiciones del sujeto puede realizarse de cualquier manera conveniente, incluyendo mediante inhalación por aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Las composiciones aquí descritas se pueden administrar a un paciente de manera subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, mediante inyección intravenosa (i.v.), o intraperitoneal. En una modalidad, las composiciones de célula T de la presente invención se administran a un paciente mediante inyección intradérmica o subcutánea. En otra modalidad, las composiciones de células T de la presente invención se administran preferentemente mediante inyección i.v. Las composiciones de células T pueden inyectarse directamente en un tumor, nódulo linfático o sitio de la infección.

En ciertas modalidades de la presente invención, las células activadas y expandidas que usan los métodos aquí descritos, u otros métodos conocidos en la técnica donde las células T se expanden a niveles terapéuticos, se administran a un paciente conjuntamente con (por ejemplo, simultáneamente o después) una serie de modalidades de tratamiento relevante, incluyendo pero sin limitación el tratamiento con agentes tales como terapia antiviral, cidofovir e interleucina-2, Citarabina (también conocida como ARA-C) o tratamiento con natalizumab para pacientes MS o tratamiento con efalizumab

para pacientes con psoriasis, y otros tratamientos para pacientes PML. En otras modalidades, las células T de la invención pueden usarse en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoablativos tales como CAM PATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias de anticuerpo, citoxina, fludaribina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citoquinas, e irradiación. Estos fármacos inhiben ya sea calcineurina fosfatasa dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la quinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (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; Isoniemi (anterior)). En una modalidad adicional, las composiciones de célula de la presente invención se administran a un paciente conjuntamente con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) el trasplante de médula ósea, terapia ablativa de célula T usando ya sea agentes de quimioterapia tales como, fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida, o anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. En otra modalidad, las composiciones de células de la presente invención se administran después de una terapia ablativa de célula B tal como los agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, en una modalidad, los sujetos pueden experimentar un tratamiento estándar con quimioterapia de alta dosis seguido por trasplante de célula madre de

sangre periférica. En ciertas modalidades, después del trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmune expandidas de la presente invención. En una modalidad adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

La dosificación de los tratamientos mencionados que se van a administrar a un paciente variarán con la naturaleza precisa de la condición que se va a tratar y el receptor del tratamiento. El ajuste de las dosificaciones para administración humana se puede realizar de acuerdo con las prácticas aceptadas por la técnica. La dosis para CAMPATH, por ejemplo, por lo general estará en el rango de 1 a aproximadamente 100 mg para un paciente adulto, usualmente se administra en forma diaria aunque en algunos casos se pueden usar dosis más grandes de hasta 40 mg al día (descrito en la Patente Estadounidense No. 6,120,766).

EJEMPLOS EXPERIMENTALES

La invención se describe además más detalladamente con referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan con fines de instrucción solamente, y no están destinados a ser limitantes salvo que se indique lo contrario. De este modo, la invención no deberá interpretarse de ninguna manera como limitada a los siguientes ejemplos, sino más bien, deberá interpretarse como aquella que abarca cualquiera y todas las variaciones que se

tornen evidentes como resultado del planteamiento aquí proporcionado.

Sin descripción adicional, se considera que un entendido en la técnica, usando la descripción precedente y los siguientes ejemplos ilustrativos, puede hacer y utilizar los compuestos de la presente invención y poner en práctica los métodos reivindicados. Por lo tanto, los siguientes ejemplos de trabajo señalan específicamente las modalidades preferidas de la presente invención, y no deberán interpretarse como limitantes de ninguna manera en la divulgación.

Ejemplo 1: Receptores de Cambio

Los resultados aquí presentados demuestran que los receptores quiméricos pueden ser diseñados para convertir las señales negativas en señales positivas en las células T. Se diseñaron experimentos para desarrollar un método que evita la inhibición de un factor inhibidor de tumor sistemáticamente y por lo tanto todo el sistema inmune. En resumen, las células T fueron diseñadas para expresar un receptor quimérico que codificó el dominio extracelular PD-1 (sin el dominio PD-1 inhibidor) y un dominio de señalización CD28 o ICOS estimulador. La orientación del receptor quimérico colocó el dominio extracelular PD-1 fuera de la célula y el dominio estimulador CD28 o ICOS dentro de la célula T. De este modo, la interacción de las células T con los antígenos de tumor en el microambiente tumoral es positivamente influenciada con la disposición de los ligandos

PD-1 porque la señal en la célula es derivada por el endodominio de señalización CD28 o ICOS en lugar del endodominio PD-1 inhibidor nativo.

Los materiales y los métodos empleados en estos experimentos se describen ahora.

Materiales y Métodos

Producción del Receptor de Cambio

Los constructos fueron diseñados para el examen del receptor de cambio BTLA. Las siguientes son secuencias de cada constructo que fueron clonadas en un vector IVT basado en pGEM.64A.

BTLA; SEC ID NO: 1

AtgaagacattgacctgccatgcttggaaactgggaaattatTTTgggtcttcttcttaatcc
catatctggacatctggaacatccatgggaaagaatcatgtgatgtacagctttatataaa
gagacaatctgaacactccatcttagcaggagatcccttgaactagaatgccctgtgaaa
tactgtgctaacaggcctcatgtgacttgggtgcaagctcaatggaacaacatgtgtaaaac
ttgaagatagacaaacaagttggaaggaagagaagaacatttcatttttcttctacattt
tgaaccagtgtcttctaatgacaatgggtcataccgctgttctgcaaattttcagtcta
ctcattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaaaaagtgcctcagaacgac
cctccaaggacgaaatggcaagcagaccctggctcctgtatagtttacttcctttgggggg
attgcctctactcatcactacctgtttctgcctgttctgctgcctgagaaggcaccaagga
aagcaaaatgaactctctgacacagcaggaagggaattaacctgggttgatgctcacctta
agagtgtgacaaacagaagcaagcaccaggcaaaattcccaagtactgctatcagaaaactgg
aatTTtatgataatgacctgacctttgtttcaggatgcaggaagggtctgaagtttattct
aatccatgcctggaagaaaacaaaccaggcattgtttatgcttccctgaaccattctgtca
ttggaccgaactcaagactggcaagaaatgtaaaagaagcaccaacagaatatgcatccat
atgtgtgaggagttaa

BTLA-BTM-CD28; SEC ID NO: 2

Aagcttgccgcca**atg**aagacattgacctgccatgcttggaaactgggaaattatTTTgggtct
tcttcttaatcccatatctggacatctggaacatccatgggaaagaatcatgtgatgtaca

gctttatataaagagacaatctgaacactccatcttagcaggagatccctttgaactagaa
tgccctgtgaaatactgtgctaacaggcctcatgtgacttgggtgcaagctcaatggaacaa
catgtgtaaaacttgaagatagacaaacaagttggaaggaagagaagaacatttcattttt
cattctacatttttgaaccagtgtcttctaatacgacaatgggtcataaccgctgttctgcaa
tttcagtctaatactcattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaaaaagt
cctcagaacgaccctccaaggacgaaatggcaagcagaccctggctcctgtatagt **ttact**
tcctttggggggattgcctctactcatcactacctgtttctgcctgttctgctgcctggag
gagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccggg
cccaccgcgaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctcct
gataagcgggccgca

BTLA-BTM-CD27; SEC ID NO: 3

Aagcttggcgccatgaagacattgcctgccatgcttggaaactgggaaattattttgggtct
tcttcttaatcccatatctggacatctggaacatccatgggaaagaatcatgtgatgtaca
gctttatataaagagacaatctgaacactccatcttagcaggagatccctttgaactagaa
tgccctgtgaaatactgtgctaacaggcctcatgtgacttgggtgcaagctcaatggaacaa
catgtgtaaaacttgaagatagacaaacaagttggaaggaagagaagaacatttcattttt
cattctacatttttgaaccagtgtcttctaatacgacaatgggtcataaccgctgttctgcaa
tttcagtctaatactcattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaaaaagt
cctcagaacgaccctccaaggacgaaatggcaagcagaccctggctcctgtatagt **ttact**
tcctttggggggattgcctctactcatcactacctgtttctgcctgttctgctgcctggaa
ggaaatatagatcaaacaaggagaaagtccctgtggagcctgcagagccttgctcggttacag
ctgccccagggaggaggaggcagcaccatccccatccaggaggattaccgaaaaccggag
cctgcctgctccccctgataagcgggccgca

BTLA-ITM-CD28; SEC ID NO: 4

aagcttggcgccatgaagacattgcctgccatgcttggaaactgggaaattattttgggtct
tcttcttaatcccatatctggacatctggaacatccatgggaaagaatcatgtgatgtaca
gctttatataaagagacaatctgaacactccatcttagcaggagatccctttgaactagaa
tgccctgtgaaatactgtgctaacaggcctcatgtgacttgggtgcaagctcaatggaacaa
catgtgtaaaacttgaagatagacaaacaagttggaaggaagagaagaacatttcattttt
cattctacatttttgaaccagtgtcttctaatacgacaatgggtcataaccgctgttctgcaa
tttcagtctaatactcattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaaaaagt
cctcagaacgaccctccaaggacgaaatggcaagcagaccctggctcctgtatagt **ttctg**
gttaccataggatgtgcagcctttgttgtagtctgcattttgggatgcatacttattgag
gagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccggg
cccaccgcgaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctcct
gataagcgggccgca

BTLA-ITM-CD27; SEC ID NO: 5

Aagcttgccgccatgaagacattgcctgccatgcttggaaactgggaaattattttgggtct
 tcttcttaatcccataatctggacatctggaacatccatgggaaagaatcatgtgatgtaca
 gctttatataaagagacaatctgaacactccatcttagcaggagatccctttgaactagaa
 tgccctgtgaaataactgtgctaacaggcctcatgtgacttgggtgcaagctcaatggaacaa
 catgtgtaaaaacttgaagatagacaaacaagttggaaggaagagaagaacatttcattttt
 cattctacatttttgaaccagtgccttcctaataagacaatgggtcataccgctgttctgcaaat
 tttcagtctaatactcattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaaaaagt
 cctcagaacgaccctccaaggacgaaatggcaagcagaccctgggtcctgtatagtttctg
 gttacccataggatgtgcagcctttgtttagtctgcattttgggatgcatacttattgaa
 ggaaatatagatcaaacaaggagaaagtcctgtggagcctgcagagccttgctggttacag
 ctgccccagggaggaggaggaggcagcaccatccccatccaggaggattaccgaaaaccggag
 cctgcctgctccccctgataagcgccgca

BTLA-BTM-ICOS; SEC ID NO: 6

Aagcttgccgccatgaagacattgcctgccatgcttggaaactgggaaattattttgggtct
 tcttcttaatcccataatctggacatctggaacatccatgggaaagaatcatgtgatgtaca
 gctttatataaagagacaatctgaacactccatcttagcaggagatccctttgaactagaa
 tgccctgtgaaataactgtgctaacaggcctcatgtgacttgggtgcaagctcaatggaacaa
 catgtgtaaaaacttgaagatagacaaacaagttggaaggaagagaagaacatttcattttt
 cattctacatttttgaaccagtgccttcctaataagacaatgggtcataccgctgttctgcaaat
 tttcagtctaatactcattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaaaaagt
 cctcagaacgaccctccaaggacgaaatggcaagcagaccctgggtcctgtatagtttact
 tcctttggggggattgcctctactcatcactacctgtttctgcctgttctgctgcctgtgt
 tggcttacaaaaaagaagtattcatccagtgtgcagcaccctaacggtgaatacatgtttca
 tgagagcagtgaacacagccaaaaaatctagactcacagatgtgaccctataagcgccgc
 a

BTLA-BTM-ICOS-Z; SEC ID NO: 7

Aagcttgccgccatgaagacattgcctgccatgcttggaaactgggaaattattttgggtct
 tcttcttaatcccataatctggacatctggaacatccatgggaaagaatcatgtgatgtaca
 gctttatataaagagacaatctgaacactccatcttagcaggagatccctttgaactagaa
 tgccctgtgaaataactgtgctaacaggcctcatgtgacttgggtgcaagctcaatggaacaa
 catgtgtaaaaacttgaagatagacaaacaagttggaaggaagagaagaacatttcattttt
 cattctacatttttgaaccagtgccttcctaataagacaatgggtcataccgctgttctgcaaat
 tttcagtctaatactcattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaaaaagt
 cctcagaacgaccctccaaggacgaaatggcaagcagaccctgggtcctgtatagtttact
 tcctttggggggattgcctctactcatcactacctgtttctgcctgttctgctgcctgtgt
 tggcttacaaaaaagaagtattcatccagtgtgcagcaccctaacggtgaatacatgtttca

tgagagcagtgaaacacagccaaaaaatctagactcacagatgtgaccctatgcagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccggtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgccttcacatgcaggccctgccccctcgctaagcgggcgca

BTLA-ITM-ICOS; SEC ID NO: 8

Aagcttgccgccatgaagacattgcctgccatgcttggaactgggaaattattttgggtcttcttcttaatcccatatctggacatctggaacatccatgggaaagaatcatgtgatgtacagctttatataaagagacaatctgaacactccatcttagcaggagatccctttgaactagaaagcctgtgaaatactgtgctaacaggcctcatgtgacttggtgcaagctcaatggaacaaatgtgtgtaaaacttgaagatagacaaacaagttggaaggaagagaagaacatttcatttttcattctacattttgaaccagtgcttcctaatacgaatgggtcataccgctgttctgcaaattttcagtctaattctcattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaaaaagtgccctcagaacgaccctccaaggacgaaatggcaagcagaccctggctcctgtatagtttctggttaccataggtatgtgcagcctttgttgtagtctgcattttgggatgcatacttatttgttggttacaaaaaagaagtattcatccagtggtgcacgaccctaacggtgaatacatgttcatgagagcagtgaaacacagccaaaaaatctagactcacagatgtgaccctataagcgggccgc
a

BTLA-ITM-ICOS-Z; SEC ID NO: 9

aagcttgccgccatgaagacattgcctgccatgcttggaactgggaaattattttgggtcttcttcttaatcccatatctggacatctggaacatccatgggaaagaatcatgtgatgtacagctttatataaagagacaatctgaacactccatcttagcaggagatccctttgaactagaaagcctgtgaaatactgtgctaacaggcctcatgtgacttggtgcaagctcaatggaacaaatgtgtgtaaaacttgaagatagacaaacaagttggaaggaagagaagaacatttcatttttcattctacattttgaaccagtgcttcctaatacgaatgggtcataccgctgttctgcaaattttcagtctaattctcattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaaaaagtgccctcagaacgaccctccaaggacgaaatggcaagcagaccctggctcctgtatagtttacttctttggggggattgcctctactcatcactacctgtttctgcctgttctgctgcctgtgttggttacaaaaaagaagtattcatccagtggtgcacgaccctaacggtgaatacatgttcatgagagcagtgaaacacagccaaaaaatctagactcacagatgtgaccctatgcagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccggtaccagcagggccagaaccagctctataacgag

ctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctg
 agatgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaa
 agataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaag
 gggcacgatggcctttaccaggggtctcagtagcagccaccaaggacacctacgacgcccttc
 acatgcaggccctgccccctcgctaagcggccgca

Transducción de las células T

Los métodos de preparación de las células T usando perlas de poliestireno paramagnéticas recubiertas con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 se han descrito (Laport et al., 2003, Blood 102:20042013). La transducción lentiviral se realizó como se describe (Levine et al., 2006, Proc Natl Acad Sci USA 103:17372-17377). La electroporación de las células T con ARN se ha descrito (2010, Zhao et al., Cancer Res 70:9062) como un método para expresar estos receptores. El uso de vectores adenovirales se ha descrito (2004, Schroers et al., Exp Hematol 32:536). Una serie de otros planteamientos para expresar proteínas en células T se han descrito (2009, June et al., Nat Rev Immunol 9:704).

Análisis de citoquina

La cuantificación de los factores solubles de citoquina se realizó usando la tecnología de formación de perlas Luminex y kits adquiridos de Life Technologies (Invitrogen). Los ensayos se realizaron según el protocolo del fabricante con una curva estándar de 8 puntos generada usando una serie de dilución de 3 veces.

Los resultados de los experimentos se describen ahora.

Los resultados aquí presentados demuestran que un receptor quimérico puede ser diseñado y expresado en una célula T donde el receptor quimérico convierte las señales negativas en señales positivas en la célula T. En consecuencia, la invención proporciona un tipo de célula T adoptiva o terapia de célula NK usando células que han sido genéticamente modificadas para expresar los receptores de célula T (TCRs) o los receptores de antígeno quimérico (CARs).

Los experimentos fueron diseñados para desarrollar un método direccionado para evitar la inhibición de PD-1 sistémicamente y por lo tanto todo el sistema inmune. El método direccionado comprende administrar células T que expresan receptores quiméricos que codifican por ejemplo el dominio extracelular PD-1, y antes que el dominio PD-1 inhibidor, un dominio de señalización estimulador CD28 o ICOS en la parte intracelular de la célula T. De este modo, la interacción de las células T con los antígenos tumorales en el microambiente tumoral, porque la señal en la célula es derivada por el endodominio de señalización CD28 o ICOS, en vez de el endodominio PD-1 nativo.

Conversión de señales BTLA

En un planteamiento similar, se han construido los receptores quiméricos que codifican BTLA. El BTLA, junto con PD-1, también es un miembro de la familia CD28. El BTLA tiene varios ligandos, incluyendo HVEM, que se expresa en las

células tumorales y otras células, a menudo en el microambiente tumoral. Es bien sabido que la interacción de BTLA con los ligandos naturales en las células regula negativamente las respuestas inmunes de la célula T (Paulos et al., 2010, J Clin Invest 120:76-80; Derré et al., 2010, J Clin Invest 120:157-67; Chemnitz et al., 2006, J Immunol 176:6603-14). Para evitar receptores quiméricos comprendidos de BTLA se construyeron el dominio extracelular y los endodominios de señalización intercelular que incluyen los dominios CD28 o ICOS.

En resumen, la clonación molecular se usó para construir los receptores quiméricos ejemplares ilustrados en la Figura 1. Para examinar si la ligación de BTLA CCR expresado en la superficie de las células T podría expresarse apropiadamente y la transducción de señales mediante el dominio intracelular ICOS a CD3 zeta, IVT ARNms que codifican BTLA CCR como se indicó se electroporaron en las células T estimuladas y la expresión de superficie de BTLA se detectó mediante proteína de fusión HVEM-Fc en un tiempo diferente como se indicó (Figura 1B). Las células T electroporadas fueron estimuladas con una línea celular negativa del ligando BTLA (KTPolCD86A2) o línea celular positiva HVEM del ligando BTLA (KTCD86Flu HVEM). Veinticuatro horas posterior a la estimulación, el IL-2 producido por las células T fue examinado mediante ELISA (Figura 1C). Los resultados mostraron que fusionando el dominio extracelular BTLA con los dominios intracelulares de tanto ICOS como CD3 zeta, las células T podrían ser activadas mediante estimulación de la línea celular que expresa HVEM

del ligando BTLA, la señal BTLA de indicación podría convertirse en otras señales en forma de receptor coestimulador quimérico (CCR).

El siguiente grupo de experimentos fue diseñado para evaluar si la señal inhibidora de BTLA podía convertirse en una señal coestimuladora de CD28 mediante BTLA-CD28 CCR. Para encontrar la ventana apropiada que podría mostrar la señalización CD28, diferentes dosis de ARN (ug/0.1ml de células T) se electroporaron en las células T y se detectó la expresión CAR (CD19z, CD19-28Z) mediante FACS. El panel superior muestra los histogramas y el porcentaje de la expresión del transgen (Figura 2A). La producción IL2 de las células T electroporadas con ARN como se describe en la Figura 2A se estimuló mediante la línea celular positiva CD19 y la producción de IL-2 se examinó mediante ELISA, como se muestra en la Figura 2B. El panel superior muestra IFN-gamma y el panel inferior muestra la producción de IL-2. Los resultados muestran que la dosis de ARN de 1-5 ug, diferente a las células T electroporadas de ARN CD19-28z, que mostraron sobre 300pg/ml de producción IL-2, no había producción de IL-2 detectable para las células T electroporadas CD19Z ARN producción de IFN-gamma podría detectarse a niveles similares tanto para las células T electroporadas CD19z como CD19-28Z con la dosis de RNA de 1.5 ug. Por lo tanto, 1.5 ug de ARN se usó como la dosis de ARN para examinar el polipéptido de conversión de señal BTLA-CD28.

Las células T co-electroporadas con 1.5ug de CD19z y BTLA CCR como se indicó y estimuló con K562 que expresa CD19 (K562CD19) o tanto CD19 como HVEM (K562CD19/HVEM). Se usó como controles la mesotelina que expresa las líneas K562 (con o sin HVEM) (Figura 2C). Los resultados muestran que el BTLA de longitud completa (tipo natural) suprimió tanto la producción de IL2 como IFN-gamma. No hubo producción de IL-2 detectable para las células T electroporadas con solamente CD19z cuando se estimuló con la línea celular positiva doble CD19/HVEM, mientras que las células T electroporadas con CD19-28z y estimuladas con la línea celular positiva doble CD19/HVEM produjo más de 400pg/ml IL-2. Sin embargo, cuando las células T fueron electroporadas con tanto CD19z como BTLA-CD28 CCR ARNs, la producción de IL-2 fue 4 veces mayor que las células T electroporadas CD19-28z, cuando se estimuló con la línea celular positiva doble CD19/HVEM. Las células T co-electroporadas con tanto CD19z como BTLA-CD28 CCR ARNs produjeron mayor IFN-gamma que las células T electroporadas CD19z o CD19-28z, cuando se estimuló con la línea celular positiva doble CD19/HVEM, o CD19 positivo K562 que expresa bajos niveles de HVEM (Figura 2C). Los resultados aquí presentados demuestran que las señales inhibitoras de BTLA podrían convertirse en señales CD28 mediante BTLA-CD28 CCR.

El siguiente grupo de experimentos fue diseñado para examinar si la señal BTLA inhibitora podía convertirse en una señal ICOS coestimuladora mediante BTLA-ICOS CCR. En resumen, la conversión de BTLA en señal ICOS se examinó en un sistema de polarización Th17 como se muestra en la Figura 3A.

Las células T CD4 en reposo fueron electroporadas con CCRs CD19z y BTLA como se indica (Tratamiento) y se estimula con la línea celular positiva doble CD19/HVEM (Grupo 1 y 2, duplicados), o las células fueron electroporadas con BTLA-ICOS solo y se estimularon con HVEM-Fc y OKT3 unido con placa (grupo 3). Las perlas CD3/ICOS o las perlas CD3/CD28 se usaron como controles positivo y negativo respectivamente como se describió (2010, Paulos et al., Science Translational Medicine). Todos los cultivos se realizaron en presencia de un cóctel de citoquina Th17. En días diferentes (como se indicó) posterior a la estimulación, las células T fueron estimuladas con PMA/Ionomicina se detectó IL-17A e IFN-gamma mediante tinción de citoquina intracelular (Figura 3B). Los resultados mostraron que la señal ICOS se convirtió de BTLA-ICOS producción de célula Th17 mejorada en presencia de las señales inhibitoras HVEM.

Conversión de PD-1 en señales CD28

Para examinar si la ligación de PD1 CCR expresado en la superficie de las células T pueden expresarse funcionalmente para transducir las señales mediante el dominio intracelular CD28 o CD27 o ICOS, se usaron IVT ARNs que codifican PD1 CCR (secuencias mostradas a continuación).

PD1-I-ICOS; SEC ID NO. 10

Atgcagatccacagggcgccctggccagtcgtctgggcggtgctacaactgggctggcggc
caggatggttcttagactccccagacaggccctggaacccccccaccttctccccagccct
gctcgtggtgaccgaaggggacaacgccaccttcacctgcagcttctccaacacatcgag
agcttcgtgctaaactggtaccgcatgagccccagcaaccagacggacaagctggccgcct

tccccgaggaccgcagccagcccggccaggactgccgcttccgtgtcacacaactgcccaa
cgggcgtgacttccacatgagcgtggtcagggccccggcgcaatgacagcggcacctacctc
tgtggggccatctccctggcccccaaggcgcagatcaaagagagcctgcgggcagagctca
gggtgacagagagaagggcagaagtgccacagcccaccccagcccctcaccaggccagc
cggccagttccaaaccctggtggttctgggttaccataggtatgtgcagcctttggtgtagtc
tgcattttgggatgcatacttatttgggttacaaaaagaagtattcatccagtgtgc
acgaccctaacggtgaatacatgttcatgagagcagtgaacacagccaaaaaatctagact
cacagatgtgaccctataa

PD1-28-CD28; SEC ID NO. 11

Atgcagatcccacaggcgccctggccagtcgtctgggcggtgctacaactgggctggcggc
caggatggttcttagactccccagacaggccctggaacccccccaccttctccccagccct
gctcgtggtgaccgaaggggacaacgccaccttcacctgcagcttctccaacacatcggag
agcttcgtgctaaactggtaccgcatgagccccagcaaccagacggacaagctggccgcct
tccccgaggaccgcagccagcccggccaggactgccgcttccgtgtcacacaactgcccaa
cgggcgtgacttccacatgagcgtggtcagggcccgcgcaatgacagcggcacctacctc
tgtggggccatctccctggcccccaaggcgcagatcaaagagagcctgcgggcagagctca
gggtgacagagagaagggcagaagtgccacagcccaccccagcccctcaccaggccagc
cggccagttccaaaccctggtggttttgggtgctggtggtggttggaggagtcctggcttgc
tatagcttgctagtaacagtggcctttattattttctgggtgaggagtaagaggagcaggc
tcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgcccggcccccacccgcaagcatta
ccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctcctaa

PD1-CD27; SEC ID NO. 12

Atgcagatcccacaggcgccctggccagtcgtctgggcggtgctacaactgggctggcggc
caggatggttcttagactccccagacaggccctggaacccccccaccttctccccagccct
gctcgtggtgaccgaaggggacaacgccaccttcacctgcagcttctccaacacatcggag
agcttcgtgctaaactggtaccgcatgagccccagcaaccagacggacaagctggccgcct
tccccgaggaccgcagccagcccggccaggactgccgcttccgtgtcacacaactgcccaa
cgggcgtgacttccacatgagcgtggtcagggccccggcgcaatgacagcggcacctacctc
tgtggggccatctccctggcccccaaggcgcagatcaaagagagcctgcgggcagagctca
gggtgacagagagaagggcagaagtgccacagcccaccccagcccctcaccaggccagc
cggccagttccaaaccctggtgatccttgtgatcttctctggaatgttccttgttttcacc
ctggccggggccctgttcctccatcaacgaaggaaatatagatcaaacaaggagaaagtc
ctgtggagcctgcagagccttgtcgttacagctgccccaggaggaggaggaggcagcaccat
ccccatccaggaggattaccgaaaaccggagcctgcctgctccccctaa

PD1 CCR como se indicó y CD19z ARN fueron electroporados en células T estimuladas y los transgenes fueron detectados mediante anti-PD1 y anti-CAR Abs en los puntos de tiempo según se indicó (Figura 4A). Las células T co-electroporadas como se describen en la Figura 4A fueron co-cultivadas con Nalm6 (línea de leucemia de célula B humana) que expresa PD-L1 o GFP como control, o K562-CD19 que expresa PD-L1, o ICOSL como control. La producción de IFN-gamma se ensayó 24 horas después del co-cultivo. Las células T co-introducidas con CD19z y PD1-CD28 (PD1-28) mostraron una producción de IFN-gamma significativamente mayor que las células T electroporadas con CD19z solo, o co-electroporadas con PD1 estando el dominio citoplásmico truncado, o PD1-CD27 (PD1-27). Cuando se co-cultivó con líneas celulares positivas doble CD19/PD-L1. Se observó una fuerte inhibición de células T cuando las células T fueron co-electroporadas con CD19z y PD1 (tipo natural) de longitud completa y estimuladas con líneas celulares positivas dobles CD19/PD-L1 (Figura 4B).

Las células T co-electroporadas como se describe en la Figura 4a fueron co-cultivadas con Nalm6 (línea de leucemia de célula B humana) que expresa PD-L1 o GFP como control, o K562-CD19 que expresa PD-L1, o ICOSL como control. La producción de IL-2 fue ensayada 24 horas después del co-cultivo. Las células T co-introducidas con C D19z y PD1-CD28 (PD1-28) mostraron una producción de IL-2 significativamente mayor que las células T electroporadas con CD19z solo, o co-electroporadas con PD1 estando el dominio citoplásmico truncado, o PD1-CD27 (PD1-27). Cuando se co-cultivó con las

líneas celulares positivas dobles CD19/PD-L1, se observó una fuerte inhibición de células T cuando las células T se co-electroporaron con CD19z y PD1 de cadena completa y se estimularon con las líneas celulares positivas dobles CD19/PD-L1 (Figura 4C).

Las células T co-electroporadas como se describen en la Figura 4A fueron examinadas en un ensayo CTL basado en el flujo. Las células T co-introducidas con CD19z y PD1 mostraron una capacidad de matar significativamente reducida contra las dianas Nalm6-PD-L1, mientras no se vieron diferencias significativas para las células T co-electroporadas con PD1 CCRs comparado con las células T electroporadas con CD19z solo, cuando se usa Nalm6-PD1 como diana. Cuando Nalm6 negativo de ligando PD1 se usó como diana, no se encontraron diferencias significativas para todos los grupos de célula T, incluyendo las células T co-electroporadas con CD19z y PD1.

El siguiente grupo de experimentos fue diseñado para invertir la inhibición de PD1 mediante la co-introducción de PD1-CD28 CCR. Para imitar la del microambiente tumoral o bajo una infección crónica en donde las células T son PD1 positivo, las células T estimuladas con perlas de CD3/CD28 u OKT3/PBMC/IL2 y fueron co-electroporadas con CD19z (10ug) y PD1 (5ug) con PD1 CCR (10ug) adicional como se indicó. CAR y PD1 y/o la expresión PD1 CCR fueron detectados mediante FACS un día posterior a la electroporación (Figura 5A).

Las células T electroporadas como se muestran en la Figura 5A fueron co-cultivadas con Nalm6 o K562-CD19 que expresa PD-L1. La producción de IL-2 fue ensayada después del co-cultivo durante la noche. Los resultados mostraron que había una cantidad disminuida de IL-2 producido por las células T electroporadas con CD19z solo, comparado con las mismas células T co-cultivadas con las líneas celulares positivas CD19 sin PD-L1. Sin embargo, en presencia de PD1, la producción de IL-2 fue completamente bloqueada cuando se co-cultivó con las líneas celulares positivas PD-L1, excepto que las células T co-electroporadas con PD1-CD28 (PD1-28), que mostraron una producción de IL-2 mucho mayor que CD19Z solo de células T, mientras que la expresión PD1 en las células T fueron co-cultivadas con las líneas celulares negativas PD-L1 (Figura 5B).

Las células T electroporadas como se muestra en la Figura 5A se co-cultivaron con Nalm6 o K562-CD19 que expresa PD-L1. La producción de IFN-gamma fue examinada después del co-cultivo durante la noche (Figura 5C). Un perfil de producción similar de citoquina se observó como el de la producción de IL-2 mostrada en la Figura 5B. Los resultados aquí presentados demuestran que PD1-CD28 CCR puede invertir el efecto inhibidor de PD1 y promover las funciones efectoras de la célula T.

Conversión de las señales PD1 en ICOS

Las células T CD4 fueron electroporadas con PD1 (o variantes de PD1) y CD19-z CAR ARNm (10 ug cada uno). Cuatro

horas después de la electroporación (día 0), las células T se mezclaron células K562 (0.5 : 1 = K562 : célula T) que expresan PD1 y CD19 en medios de cultivo CD10 en presencia de IL1 (10ng/ml), IL6 (10ng/ml), IL23 (20ng/ml), y anticuerpos de neutralización (10ug/ml) contra IL4 e IFN γ . En los días indicados (5, 9 y 12 días después de la electroporación) las células se incubaron durante 4 horas con PMA (3 ug/ml) e ionomicina (1 ug/ml) y GolgiStop para la tinción de citoquina intracelular. La tinción de la superficie para CD4 se realizó seguida por tinción intracelular para IFN-gamma, IL17 e IL2. Las células T CD4 estimuladas con las perlas anti-CD28/CD3 y las perlas anti-ICOS/CD3 se usaron como controles (Figura 6A). La producción de citoquina fue mejorada, particularmente en el día 9 en las células que expresan PD1-ICOS comparado con el tipo natural de PD1 o PD1 sin cola. La proliferación celular o las células T estimuladas se muestran en la Figura 6C.

Receptores quiméricos PD-1

El PD-1 es regulado hacia arriba en la superficie de las células T CD8 agotadas en los pacientes con infección viral crónica. El bloqueo de la señal PD-1:PD-L1 restaura la función de PD-1 que expresa las células T CD8 agotadas. Muchos tumores expresan PD-L1 que proporciona un microambiente inmunosupresor.

El propósito de los siguientes experimentos es dirigir las células T adoptivamente transferidas para superar el

microambiente tumoral inhibidor introduciendo los receptores quiméricos PD-1 en el sitio del tumor.

Se observó que el efecto inhibidor de PD1wt en la producción de citoquina es rescatada mediante los constructos quiméricos PD1 (Figura 7). Sin embargo, los receptores quiméricos PD1 no afectan la producción de granzima B (Figura 8). De manera similar, se observaron diferencias mínimas en la actividad de eliminación de las células T CD8 en presencia o ausencia de PD1 (Figura 9).

El siguiente grupo de experimentos fue diseñado para evaluar el efecto de los receptores quiméricos PD-1 en la proliferación de células T (Figura 10). Se observó que el receptor quimérico PD1-CD28 aumenta el número de células T CD8 (Figura 11).

En resumen, los resultados aquí presentados demuestran que los constructos quiméricos PD-1 no presentan los efectos inhibidores mostrados por PD-1 wt. El PD1-CD28 parece aumentar la producción de $\text{TNF}\alpha$, IL2 e IFN γ en las células T CD4. Los receptores quiméricos PD-1 no mostraron una citotoxicidad incrementada sobre la de las células T que expresan el mismo CD19CARz. El PD1-CD28 aumentó el número de células T sobre el de las células T que expresan el mismo CD19CARz.

Redireccionamiento de la Señalización Co-inhibidora a la Co-estimulación Positiva

Los resultados aquí presentados demuestran que los receptores de cambio se expresaron en células T mediante electroporación o con vectores lentivirales. Se observó que los CARs y los receptores de cambio se pueden expresar en la misma célula T. Cuando las células que expresan CARs o TCRs y los receptores de cambio se exponen a las células tumorales que tienen ligandos para BTLA o PD-1, se muestra que las células T tienen una respuesta inmune positiva, más bien que la respuesta inhibidora usual.

Cuando estos receptores quiméricos se expresan en células T, en el caso del receptor de cambio BTLA, con la interacción con su ligando HVEM natural en las células tumorales, se observó que las células T fueron estimuladas y luego expresaron funciones asociadas con los efectos antitumorales positivos, incluyendo la secreción de IFN-gamma.

Otro resultado importante de estos estudios es que la interacción HVEM-BTLA con el receptor quimérico conllevó a la secreción de IL-7. Esto es un marcador de células TH17, una célula que es conocida por ser útil para la inmunoterapia tumoral (Martin-Orozco et al., 2009, Immunity 31:787-98; Paulos et al., 2010, Science Translational Medicine 2:55-78; Garaude et al., 2010, Sci Transl Med 2(55):55ps2). Por ejemplo, los resultados aquí presentados demuestran que las células T que expresan los receptores de cambio CARs y BTLA

con dominios de señalización ICOS fueron polarizados para secretar grandes cantidades de IL-17.

Además, los resultados aquí presentados muestran que las células T que expresan CARs y los receptores de cambio PD1 con CD28, y se evitó que los dominios eliminados tengan inhibición y a cambio eliminaron las células tumorales y secretan citoquinas (IL-2 e IFN-gamma) si expresaron receptores de cambio PD-1.

Si ánimo de limitarse por cualquier teoría particular, se considera que expresando los receptores antígenos quiméricos (CARs) con PD-1 o los receptores de cambio BTLA en las células T que son luego introducidos en el microambiente tumoral, las células T tienen un efecto antitumoral potenciado y muestran el fenotipo TH17. El tipo de transferencia de célula T adoptiva para la inmunoterapia tumoral de la invención también es aplicable en el área de la terapia de la vacuna, tal como para las infecciones virales crónicas que incluyen VIH u otros virus tales como EBV, HCV o CMV. Esta tecnología podría incorporarse fácilmente en otros ensayos que actualmente están usando células T genéticamente modificadas con TCRs también. Por ejemplo, los receptores de cambio de la invención se pueden usar en el contexto de las células T con TCRs específicos para los antígenos de cáncer tal como MAGE-A3 y NY-ESO-1, y se considera que la inclusión de los receptores de cambio con estas células T aumentarían la potencia de las células T.

Las divulgaciones de cada y toda patente, solicitud de patente y publicación aquí citadas se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Si bien esta invención ha sido divulgada con referencia a las modalidades específicas, es evidente que otras modalidades y variaciones de esta invención pueden ser ideadas por otros expertos en la técnica sin apartarse del verdadero espíritu y ámbito de la invención. Las reivindicaciones que se adjuntan están destinadas a ser interpretadas de modo que incluyan todas dichas modalidades y las variaciones equivalentes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La siguiente descripción detallada de las modalidades preferidas de la invención se entenderá mejor cuando se lea conjuntamente con los dibujos que se acompañan. Con la finalidad de ilustrar la invención, se muestran en los dibujos las modalidades que son actualmente preferidas. Deberá entenderse, sin embargo, que la invención no está limitada a los arreglos e instrumentaciones precisos de las modalidades mostradas en los dibujos.

La Figura 1, que comprende las Figuras 1A hasta 1C, es una serie de imágenes que demuestran que la señal BTLA puede convertirse en otras señales en forma de un receptor coestimulador quimérico (CCR) o referido por el contrario como un receptor de cambio. La Figura 1A es una imagen que ilustra una representación esquemática de receptores de cambio quiméricos. La Figura 1B es una imagen que demuestra que la expresión de superficie de BTLA fue detectada mediante proteína de fusión HVEM-Fc en un momento diferente como se indicó. La Figura 1C es una imagen que ilustra el IL-2 producido mediante células T sometidas a electroporación que fueron ya sea estimuladas con una línea celular negativa de ligando BTLA (KTP1oCD86A2) o una línea celular positiva HVEM de ligando BTLA (KTP1oCD86A2 HVEM). Veinticuatro horas posteriores a la estimulación, se examinó la producción de IL mediante ELISA. Los resultados mostraron que fusionando el dominio extracelular de BTLA con los dominios intracelulares de tanto ICOS como CD3 zeta, las células T pudieron activarse

mediante estimulación de una línea celular que expresa HVEM de ligando BTLA, la señal BTLA de indicación podría convertirse en otras señales en forma de un receptor coestimulador quimérico.

La Figura 2, que comprende las Figuras 2A hasta la 2C, es una serie de imágenes que demuestran que la señal BTLA puede convertirse en una señal CD28 hasta BTLA-CD28 CCR.

La Figura 3, que comprende las Figuras 3A y 3B, es una serie de imágenes que demuestran que la señal BTLA se puede convertir en señal ICOS hasta BTLA-ICOS CCR. Los resultados mostraron que la señal ICOS convertida a partir de BTLA-ICOS mejoró la producción de la célula Th17.

La Figura 4, que comprende las Figuras 4A hasta la 4D, es una serie de imágenes que demuestran que las señales PD1 pueden convertirse en señales CD28.

La Figura 5, que comprende las Figuras 5A y 5C, es una serie de imágenes que demuestran la inversión de la inhibición de PD1 mediante co-introducción de PD1-CD28 CCR.

La Figura 6, que comprende las Figuras 6A hasta 6C, es una serie de imágenes que demuestran la conversión de la señal PD1 en señal ICOS.

La Figura 7 es una imagen que demuestra que el efecto inhibidor de PD1wt en la producción de citoquina es rescatado por los constructos quiméricos de PD1.

La Figura 8 es una imagen que demuestra que los receptores quiméricos de PD-1 no afectan la producción de la granzima B.

La Figura 9 es una imagen que demuestra que las diferencias mínimas se observaron en la actividad de matanza de las células T CD8 en presencia o ausencia de PD1.

La Figura 10 es una imagen que muestra el efecto de los receptores quiméricos de PD-1 en la proliferación de la célula T.

La Figura 11 es una imagen que muestra que el receptor quimérico PD1-CD28 aumenta el número de células T CD8.

REIVINDICACIONES:

1. Una proteína de fusión que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en donde dicho primer dominio es un polipéptido que está asociado con una señal negativa y dicho segundo dominio es un polipéptido que está asociado con una señal positiva.
2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde dicho primer dominio es por lo menos una porción del dominio extracelular del polipéptido que está asociado con una señal negativa y dicho segundo dominio es por lo menos una porción del dominio intracelular del polipéptido que está asociado con una señal positiva.
3. La proteína de fusión de la reivindicación 1, que comprende además un dominio de transmembrana.
4. La proteína de fusión de la reivindicación 3, en donde dicho dominio de transmembrana es el dominio de transmembrana del polipéptido que está asociado con una señal negativa o el dominio de transmembrana del polipéptido que está asociado con una señal positiva.
5. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido que está asociado con una señal negativa se selecciona del grupo que consiste de CTLA4, PD-1 y BTLA.

6. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido que está asociado con una señal positiva se selecciona del grupo que consiste de CD28 e ICOS.
7. Una célula diseñada para expresar una proteína de fusión que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en donde dicho dominio es un polipéptido que está asociado con una señal negativa y dicho segundo dominio es un polipéptido que está asociado con una señal positiva.
8. La célula de la reivindicación 7 que comprende además un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde dicho CAR comprende un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico y un dominio intracelular de la cadena CD3-zeta.
9. Un vector que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en donde dicho primer dominio es un polipéptido que está asociado con una señal negativa y dicho segundo dominio es un polipéptido que está asociado con una señal positiva.
10. Un método para tratar a un paciente con cáncer, comprendiendo dicho método administrar a dicho paciente una célula T genéticamente diseñada para expresar una proteína de fusión que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en donde dicho primer dominio es un polipéptido que está asociado con una señal negativa y

dicho segundo dominio es un polipéptido que está asociado con una señal positiva.

11. El método de la reivindicación 10, en donde dicha célula T está además genéticamente diseñada para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde dicho CAR comprende un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico y un dominio intracelular de la cadena CD3-zeta.

12. El método de la reivindicación 11, en donde dicha célula T es una célula T autóloga.

RECEPTORES COESTIMULADORES DE CAMBIO

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una proteína de fusión que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en donde el primer dominio es un polipéptido que está asociado con una señal negativa y el segundo dominio es un polipéptido que está asociado con una señal positiva.

En una modalidad, el primer dominio es por lo menos una porción del dominio extracelular del polipéptido que está asociado con una señal negativa y el segundo dominio es por lo menos una porción del dominio intracelular del polipéptido que está asociado con una señal positiva.

En una modalidad, la proteína de fusión comprende además un dominio de transmembrana. En otra modalidad, el dominio de transmembrana es el dominio de transmembrana del polipéptido que está asociado con una señal negativa o el dominio de transmembrana del polipéptido que está asociado con una señal positiva.

En una modalidad, el polipéptido que está asociado con una señal negativa se selecciona del grupo que consiste de CTLA4, PD-1 y BTLA.

En una modalidad, el polipéptido que está asociado con una señal positiva se selecciona del grupo que consiste de CD28 e ICOS.

La invención proporciona además una célula diseñada para expresar una proteína de fusión que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en donde el primer dominio es un polipéptido que está asociado con una señal negativa y el segundo dominio es un polipéptido que está asociado con una señal positiva.

En una modalidad, la célula comprende además un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico y un dominio intracelular de la cadena CD3-zeta.

La invención proporciona además un vector que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en donde el primer dominio es un polipéptido que está asociado con una señal negativa y el segundo dominio es un polipéptido que está asociado con una señal positiva.

La invención proporciona un método para tratar un paciente con cáncer. En una modalidad, el método comprende administrar a un paciente una célula T genéticamente diseñada para expresar una proteína de fusión que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en donde el primer dominio es un polipéptido que está asociado con una señal negativa y el

segundo dominio es un polipéptido que está asociado con una señal positiva.

En una modalidad, la célula T es además genéticamente diseñada para expresar un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico y un dominio intracelular de la cadena CD3-zeta.

En una modalidad, la célula T es una célula T autóloga.

RESUMEN TÉCNICO

La presente invención se refiere de una manera general a una proteína de fusión que cuando se manifiesta en una célula puede convertir una señal negativa en una señal positiva en la célula. La proteína de fusión es una proteína quimérica caracterizada porque la proteína comprende por lo menos dos dominios, en donde el primer dominio es un polipéptido que está asociado con una señal negativa y el segundo dominio es un polipéptido que está asociado con una señal positiva. De este modo, la invención comprende receptores de cambio que son capaces de cambiar las señales negativas a señales positivas para la potenciación de una respuesta inmune.

Fig. 1. Receptores Quiméricos

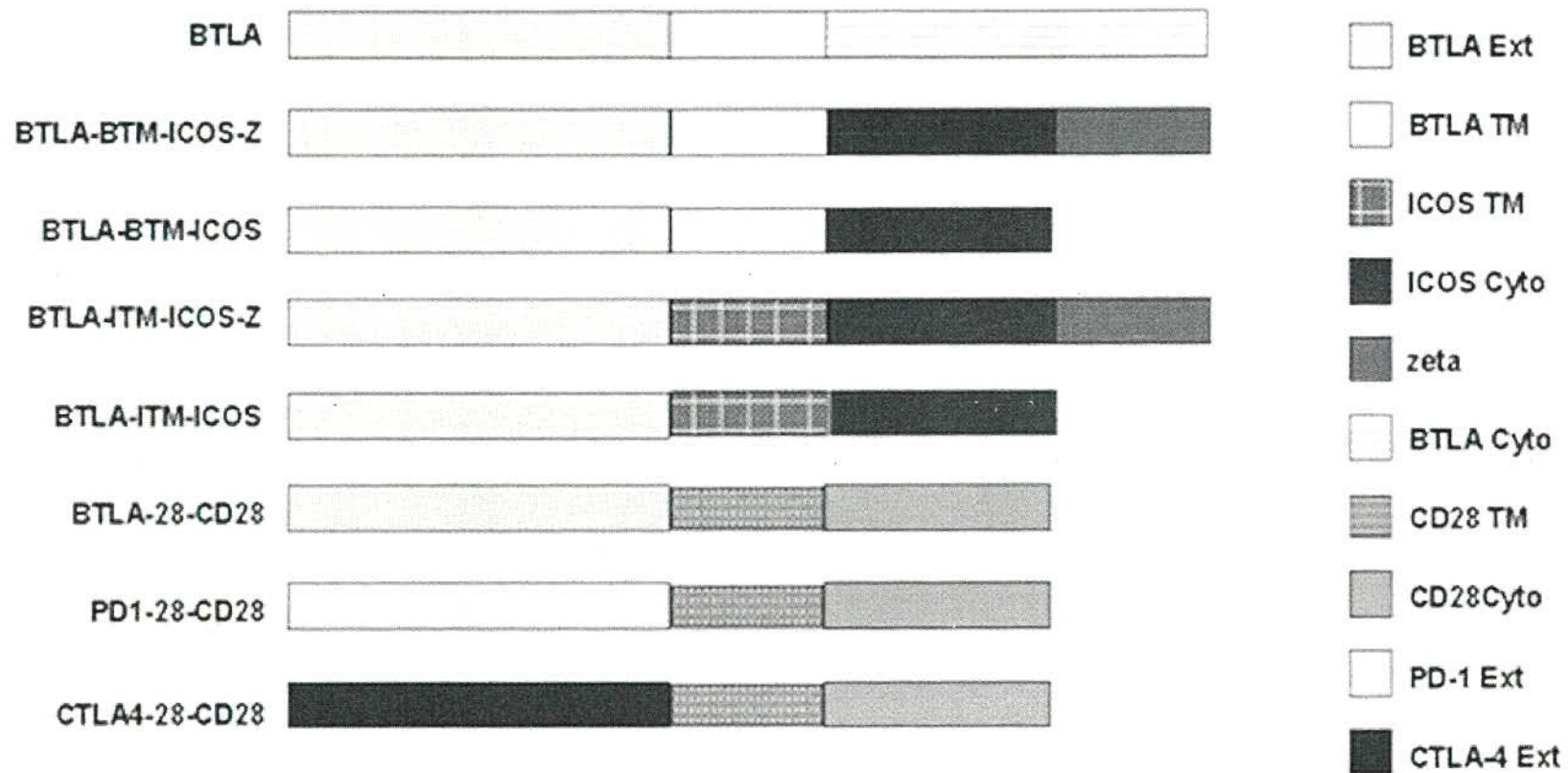
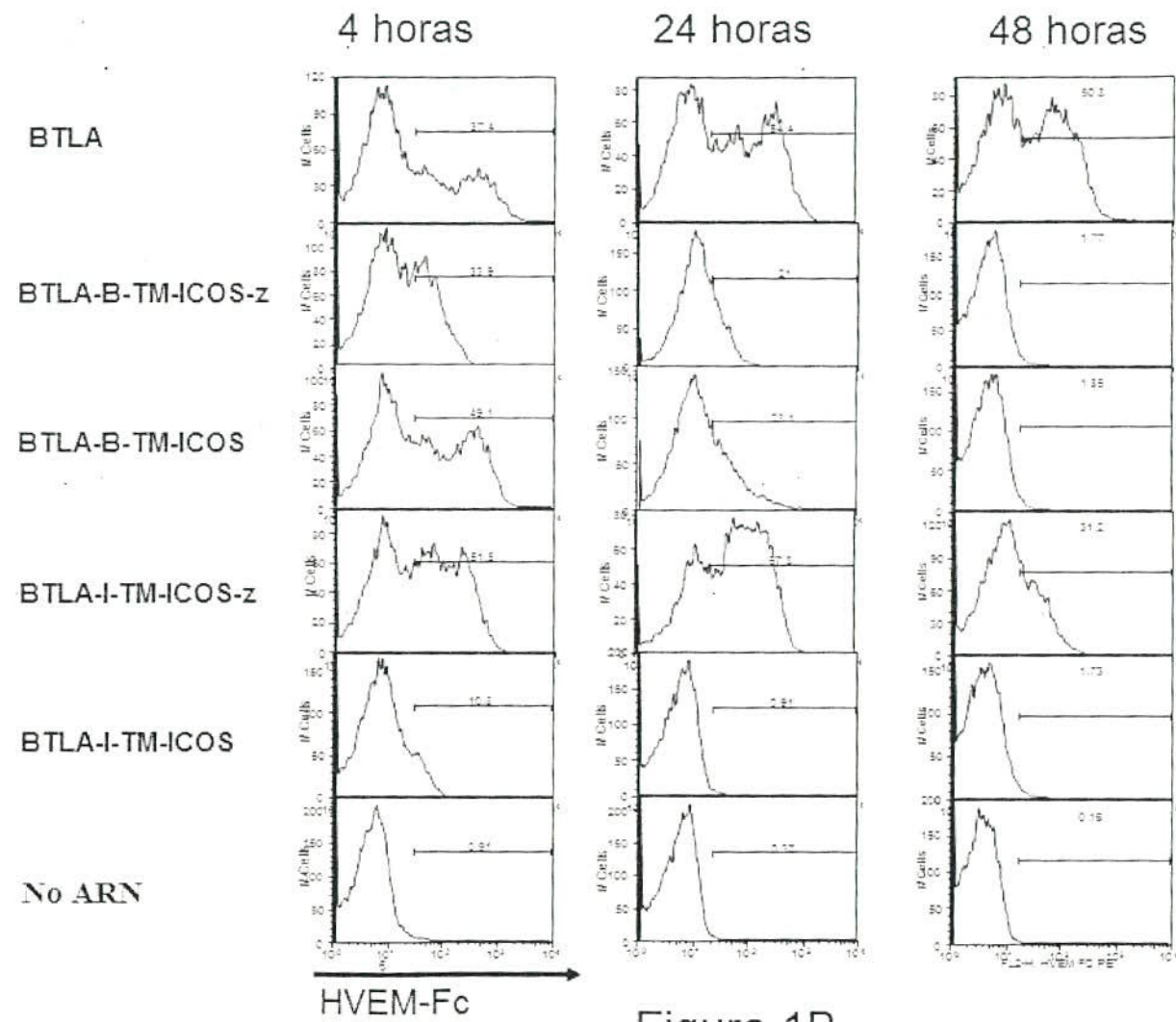


Figura 1A



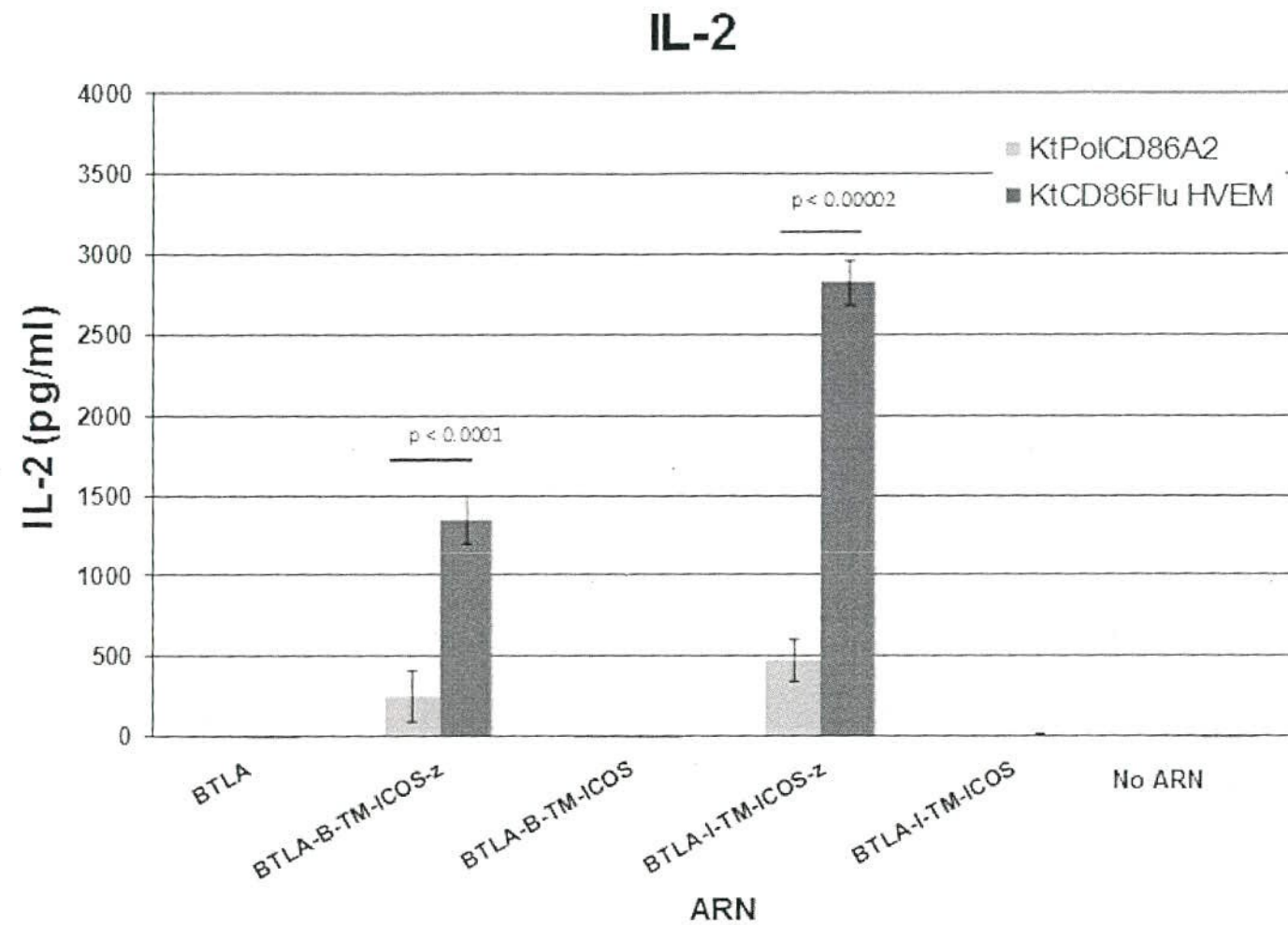


Figura 1C

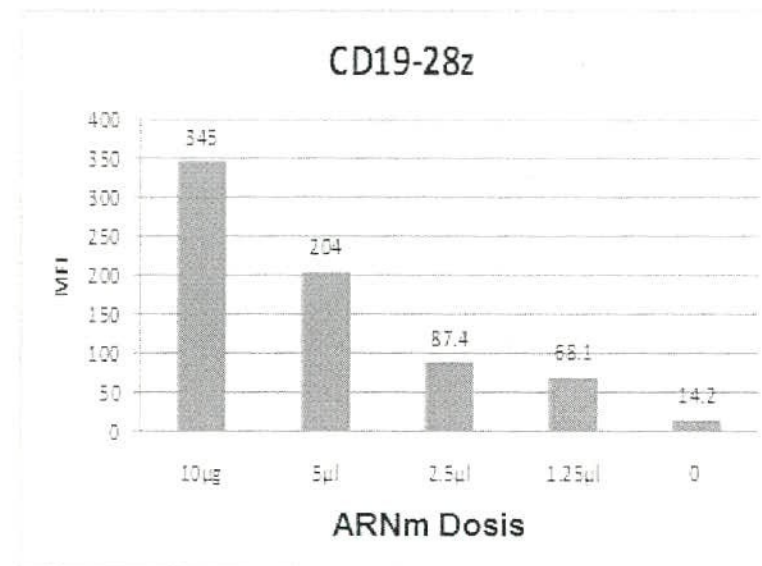
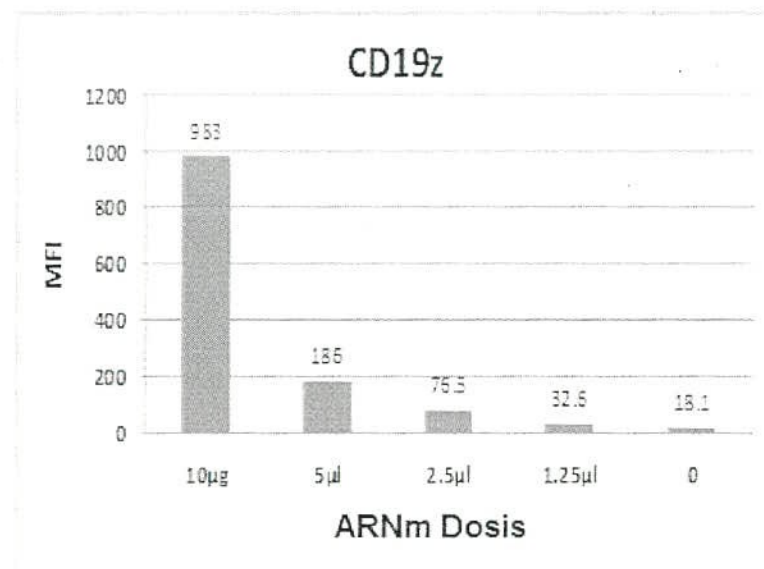
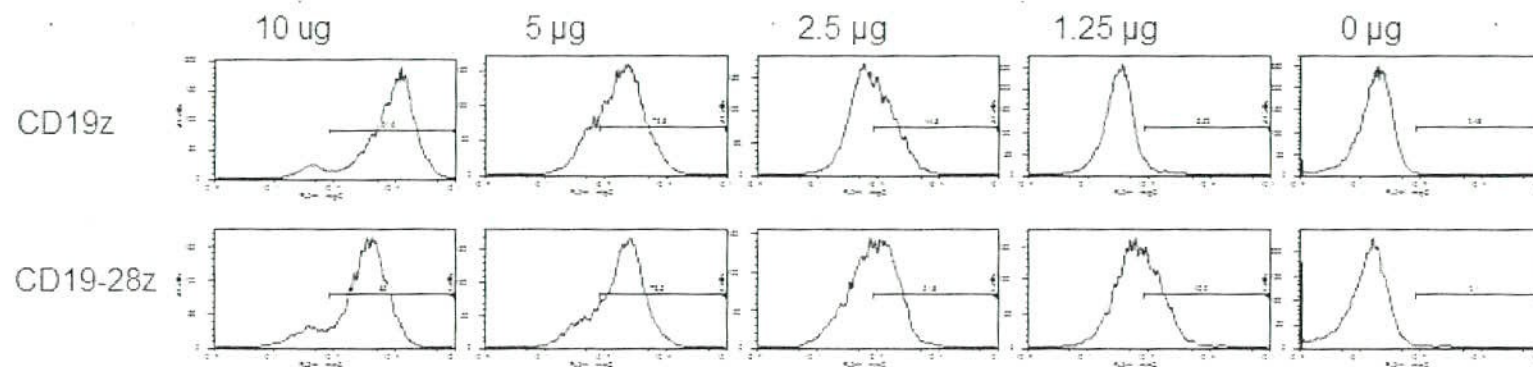


Figura 2A

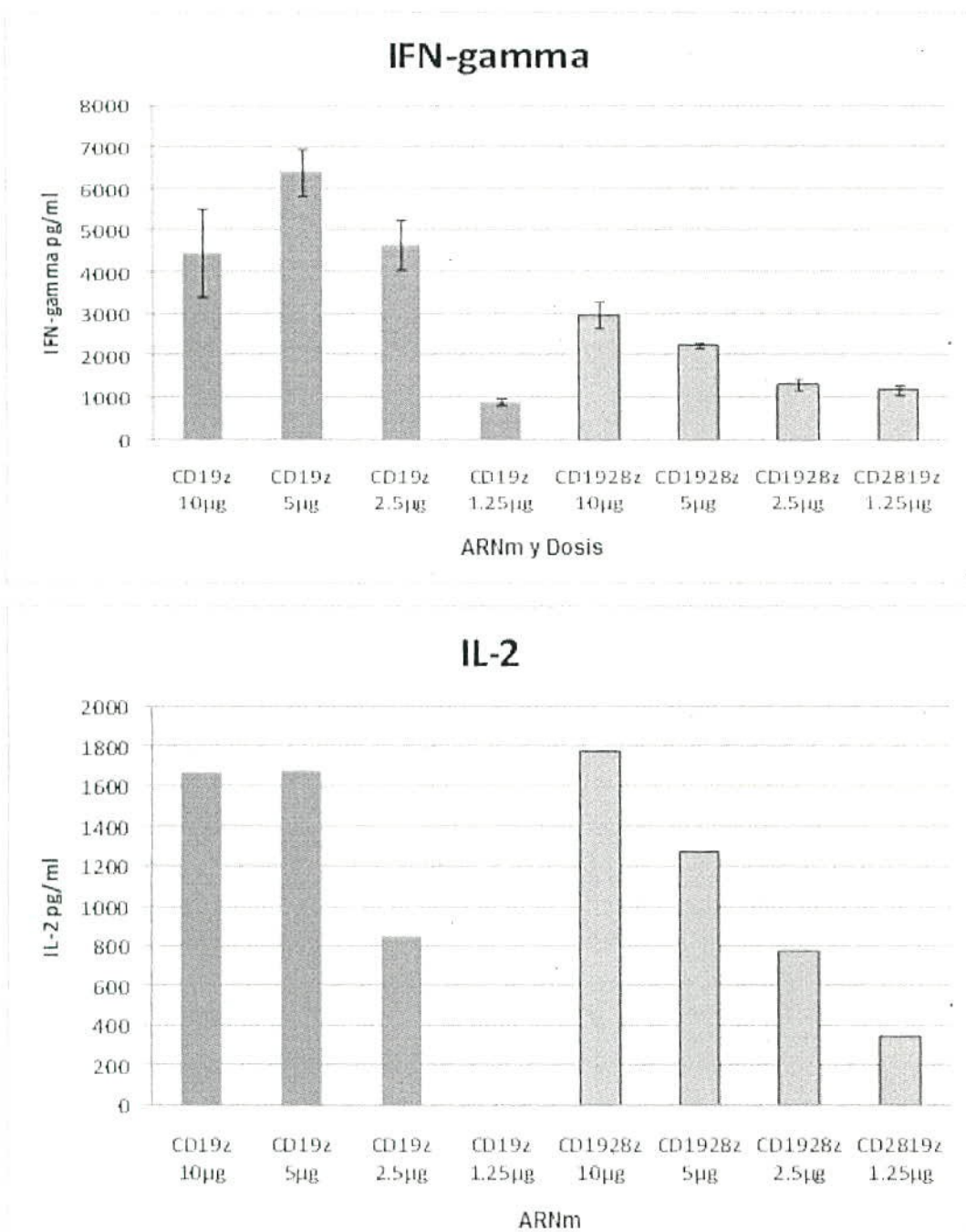


Figura 2B

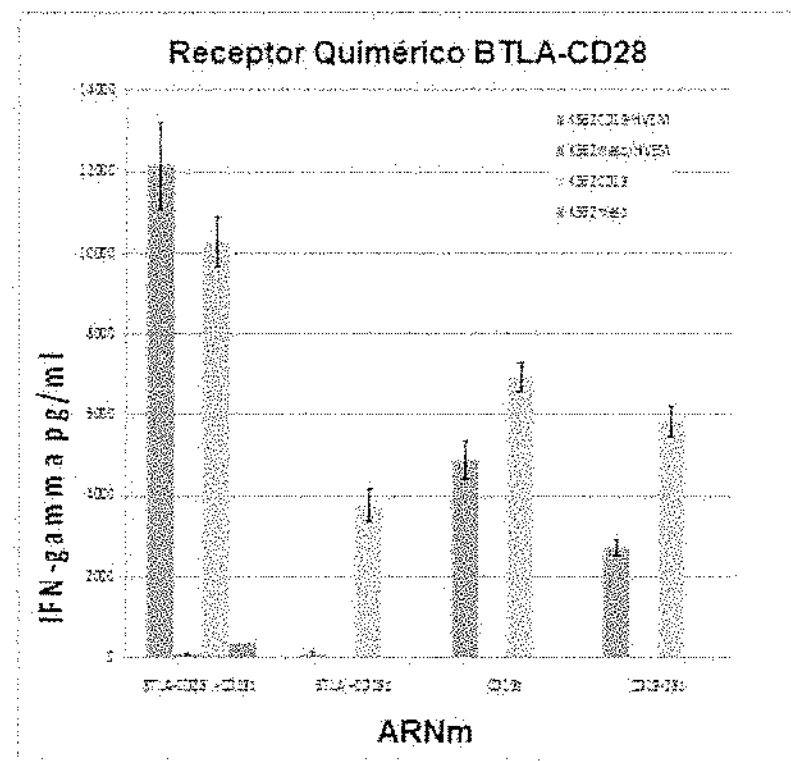
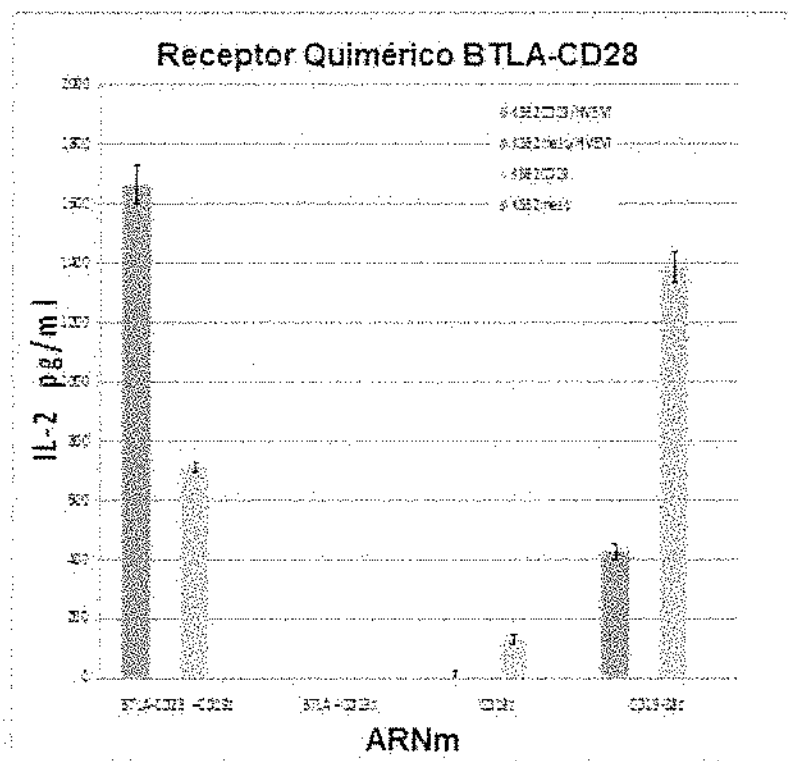


Figura 2C

Grupo	Tratamiento	Co-cultivo	Citoquinas
1	BTLA-BTM-ICOS+CD19z	K562CD19-HVEM	cóctel de citoquina Th17
2	BTLA-BTM-ICOS+CD19z	K562CD19-HVEM	cóctel de citoquina Th17
3	BTLA-BTM-ICOS	HVEM-Fc/OKT3	cóctel de citoquina Th17
4	BTLA- BTM-CD28 +CD19z	K562CD19-HVEM	cóctel de citoquina Th17
5	perlas CD3/ICOS	No	cóctel de citoquina Th17
6	perlas CD3/CD28	No	cóctel de citoquina Th17

Donante ND 365; Células CD4+ frescas

Cóctel de citoquina Th17

- IL-1 β 10ng/ml
- IL-6 10ng/ml
- IL-23 20ng/ml
- Anti-IL-410 μ g/ml
- Anti-IFN γ 10 μ l/ml
- IL-2 50u/ml inicio (día 5)

Figura 3A

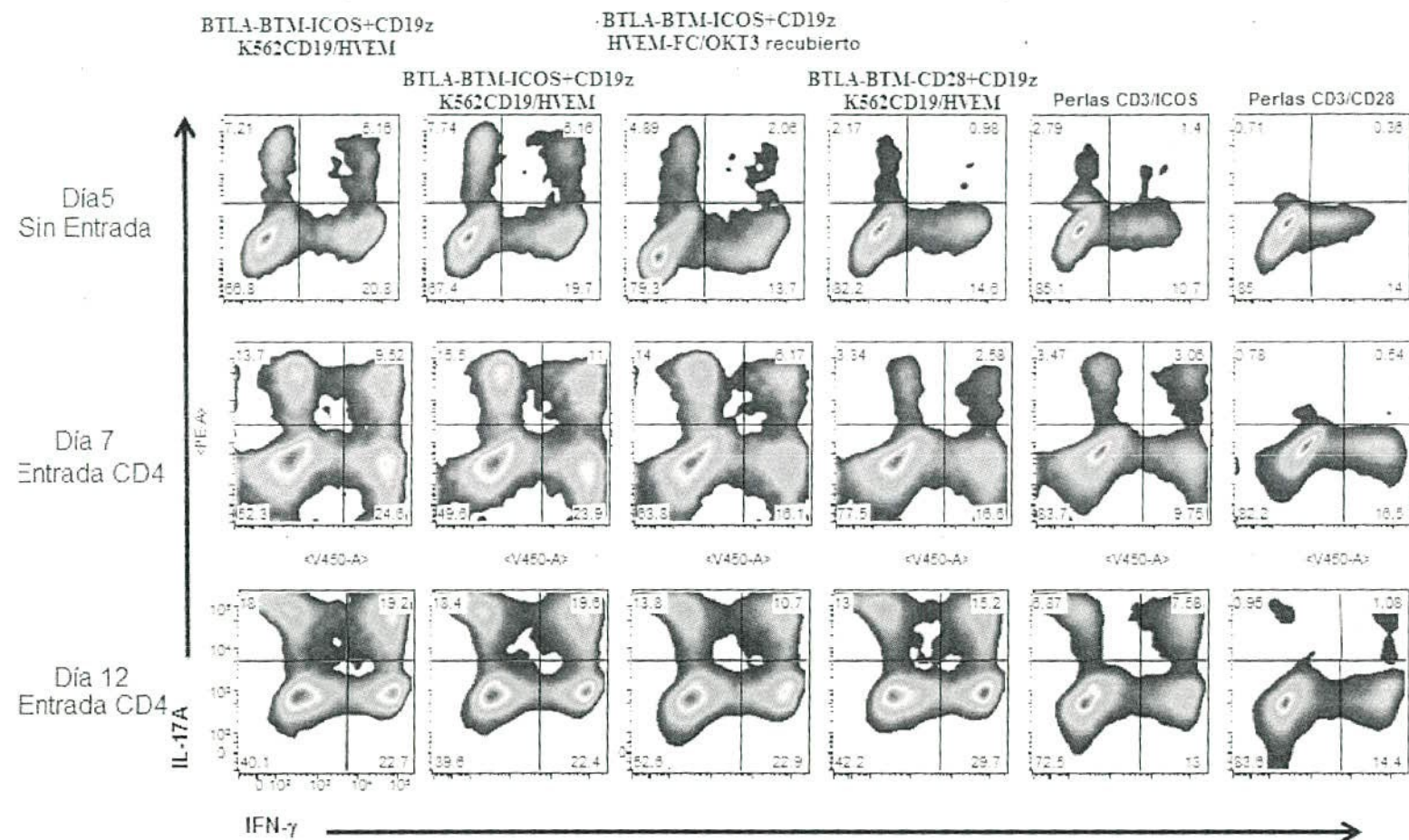


Figura 3B

CAR (19-BBZ)

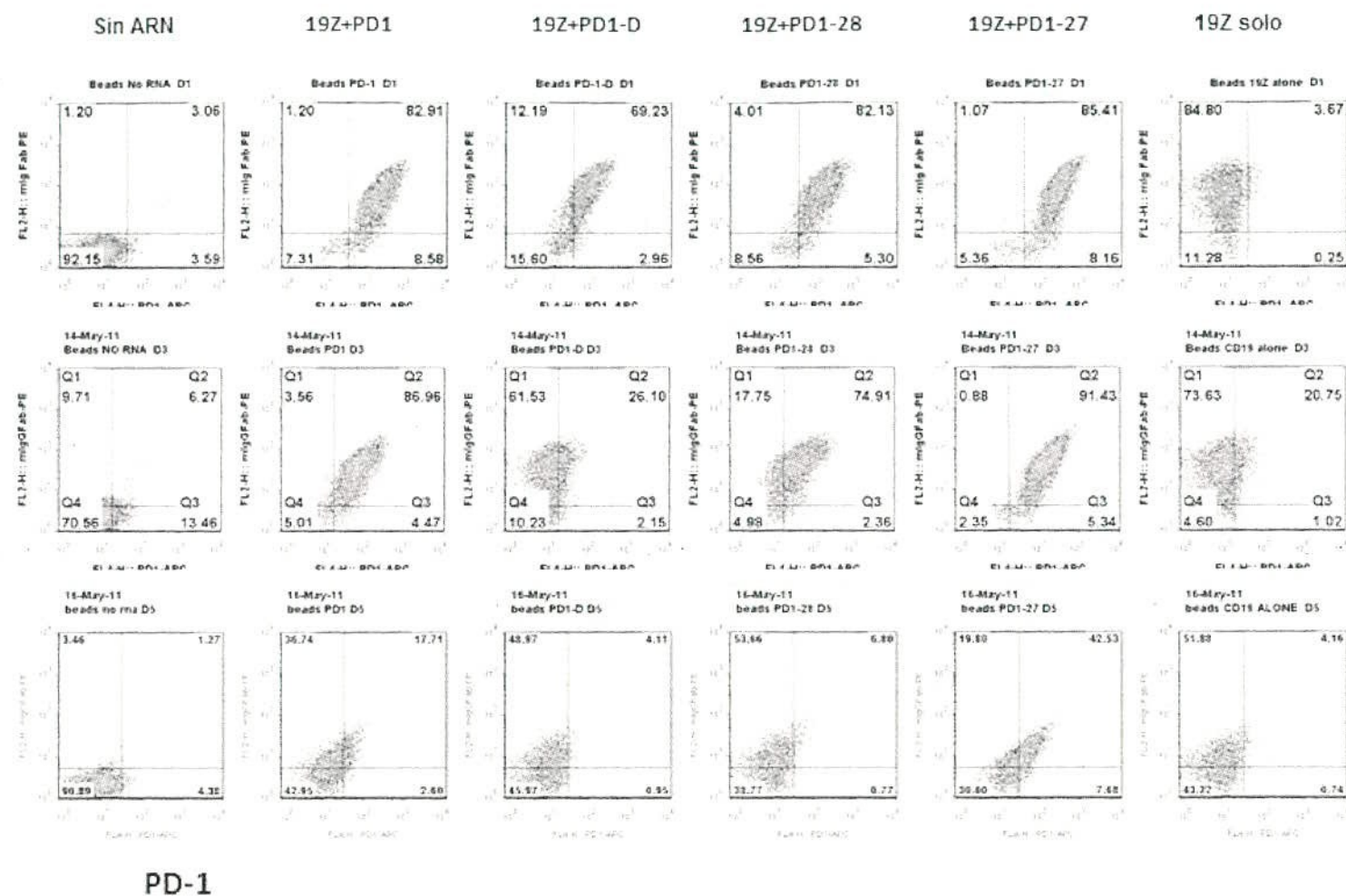


Figura 4A

Día 1

Día 3

Día 5

6

62

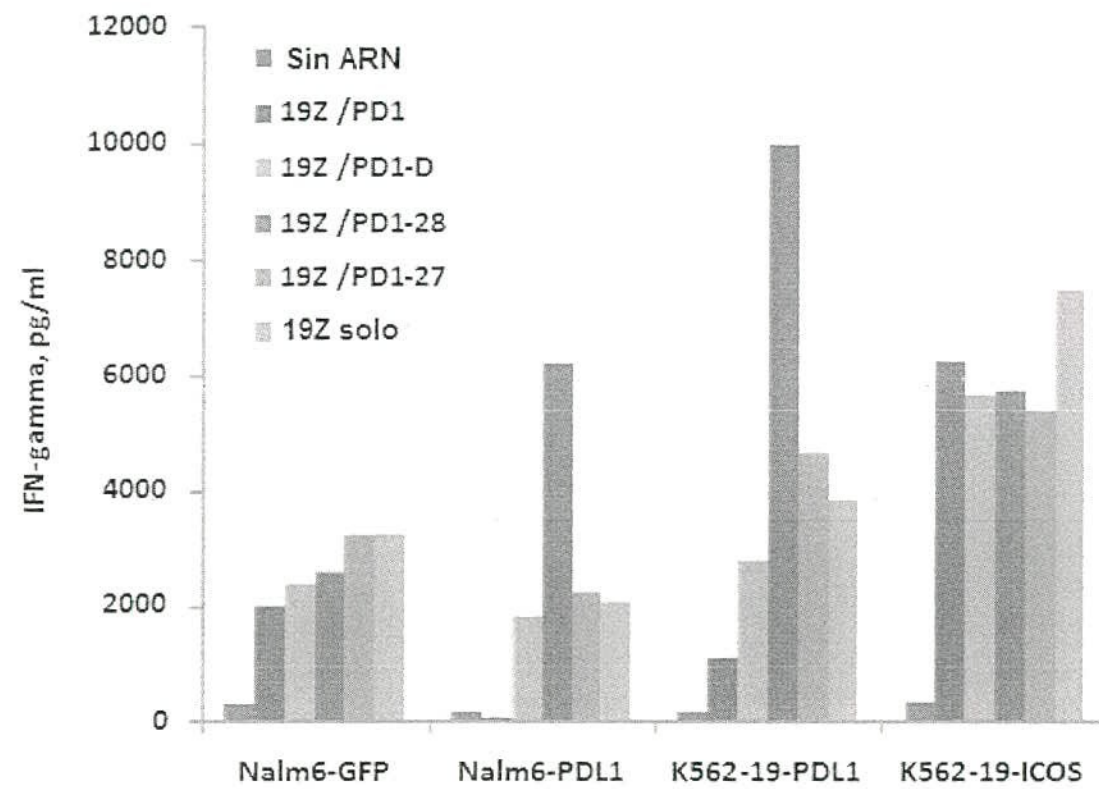


Figura 4B

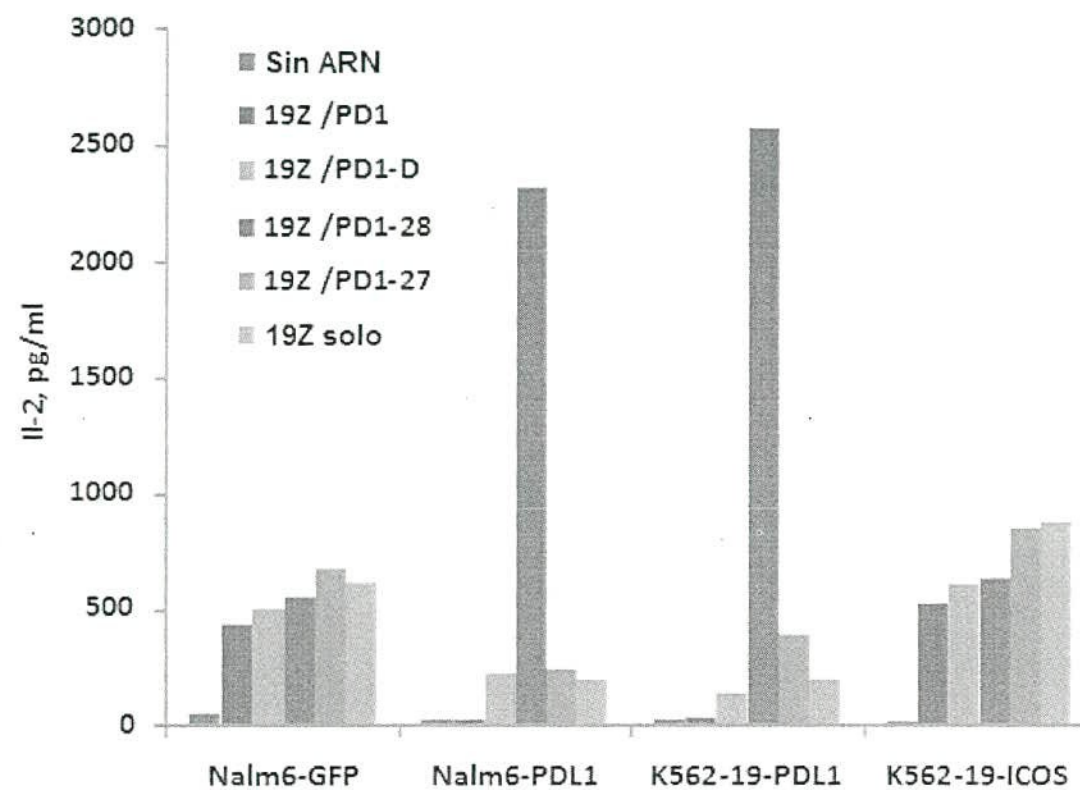


Figura 4C

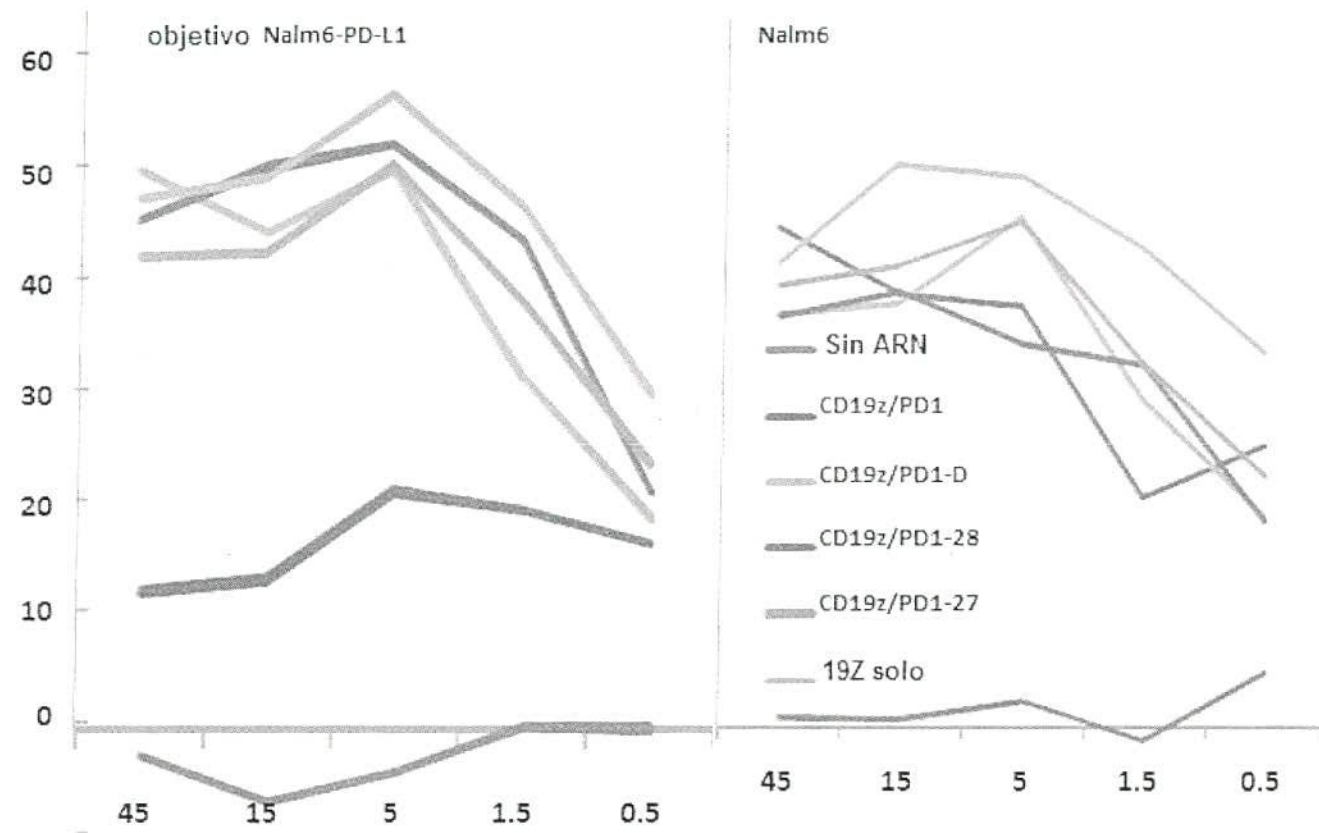


Figura 4D

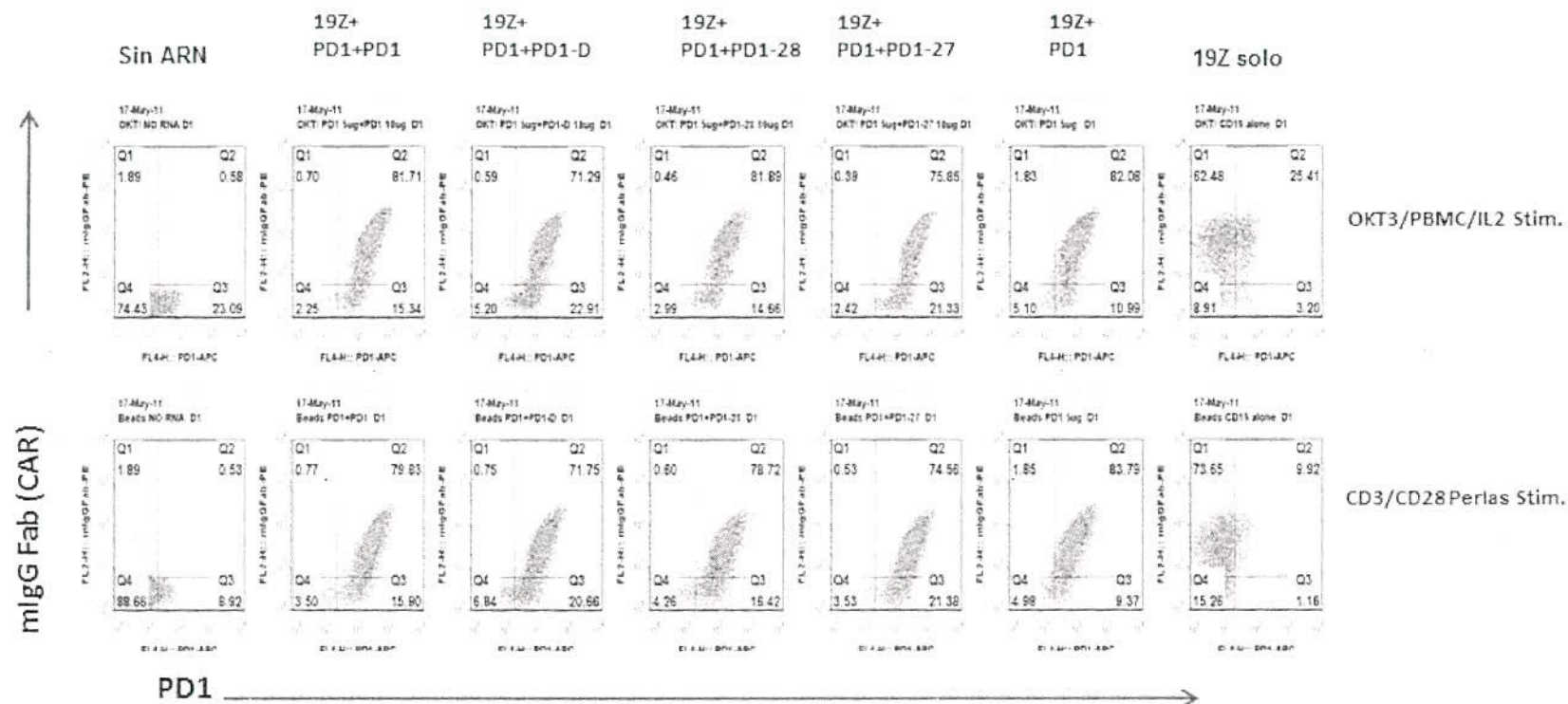


Figura 5A

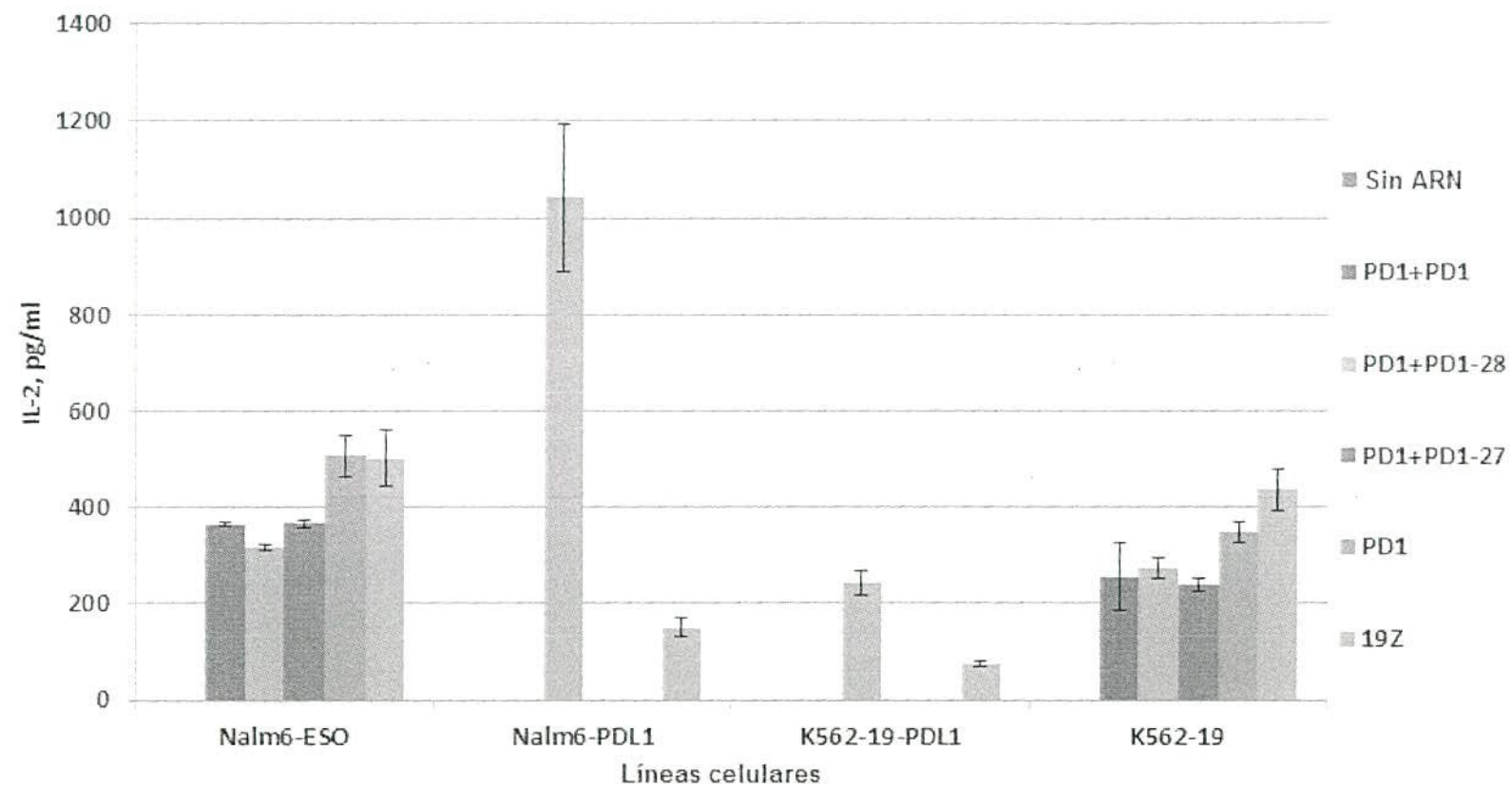


Figura 5B

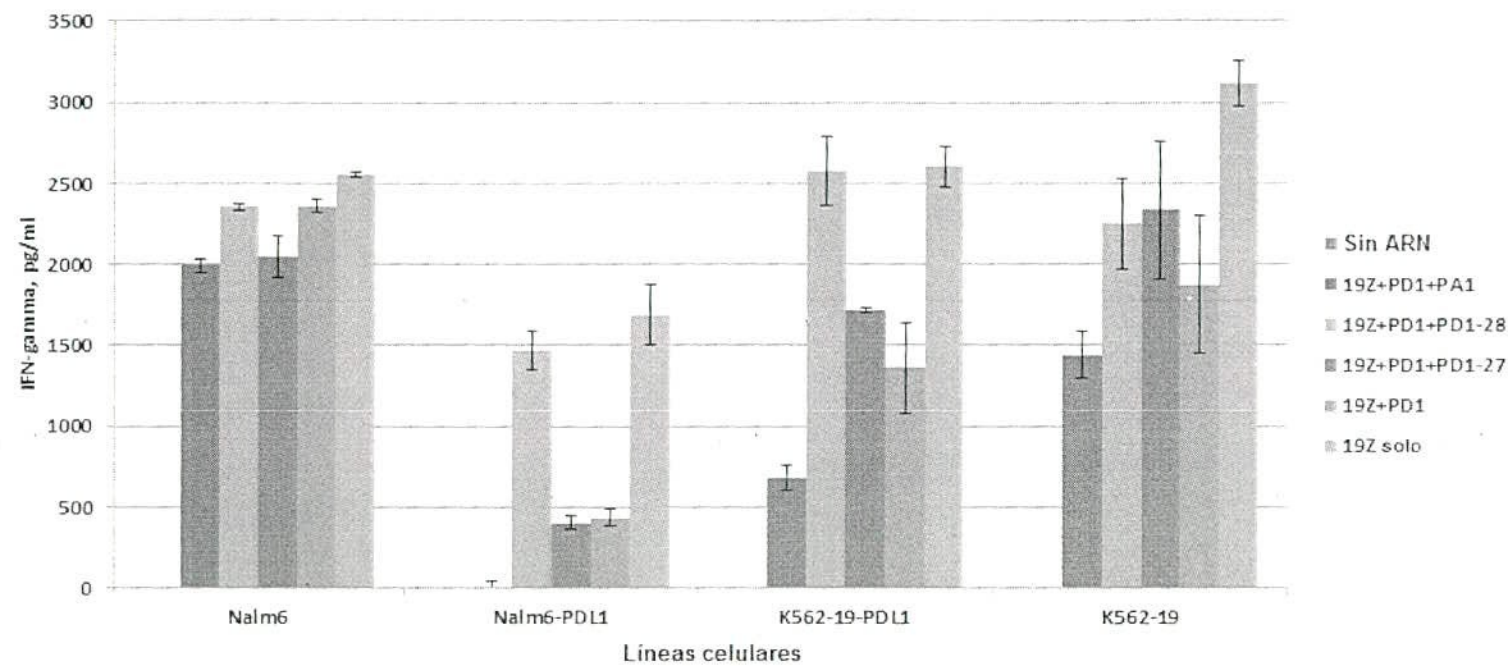


Figura 5C

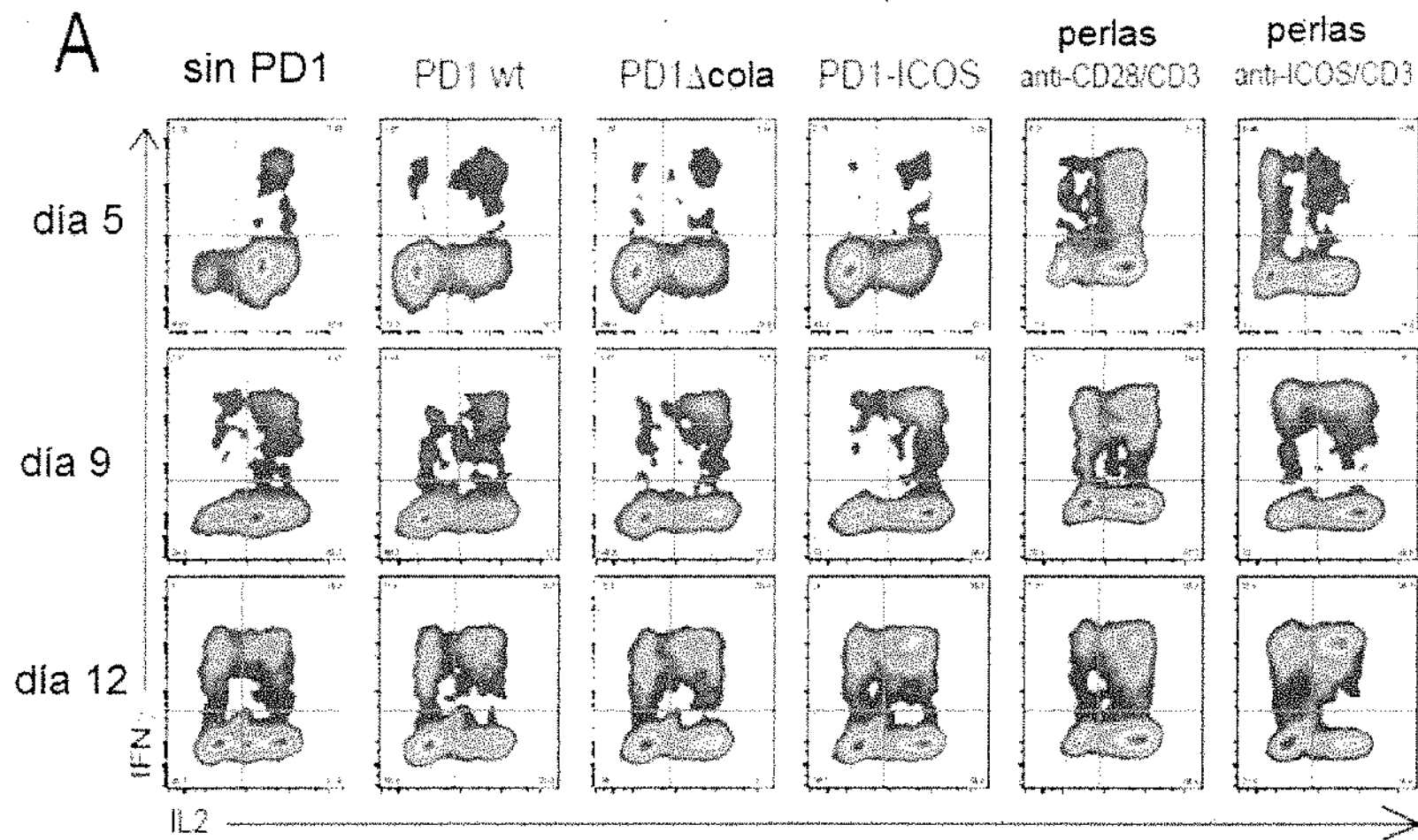


Figura 6A

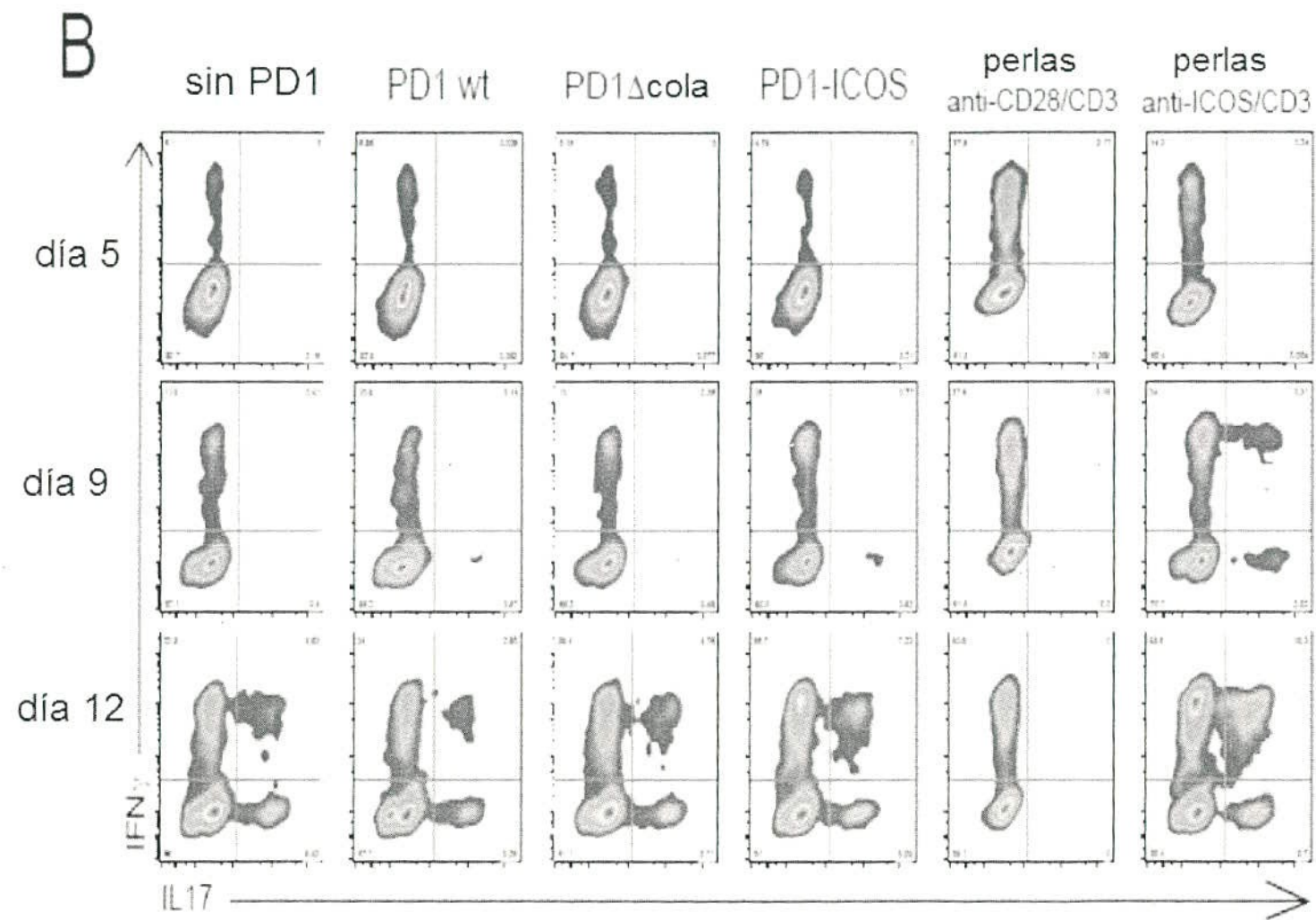


Figura 6B

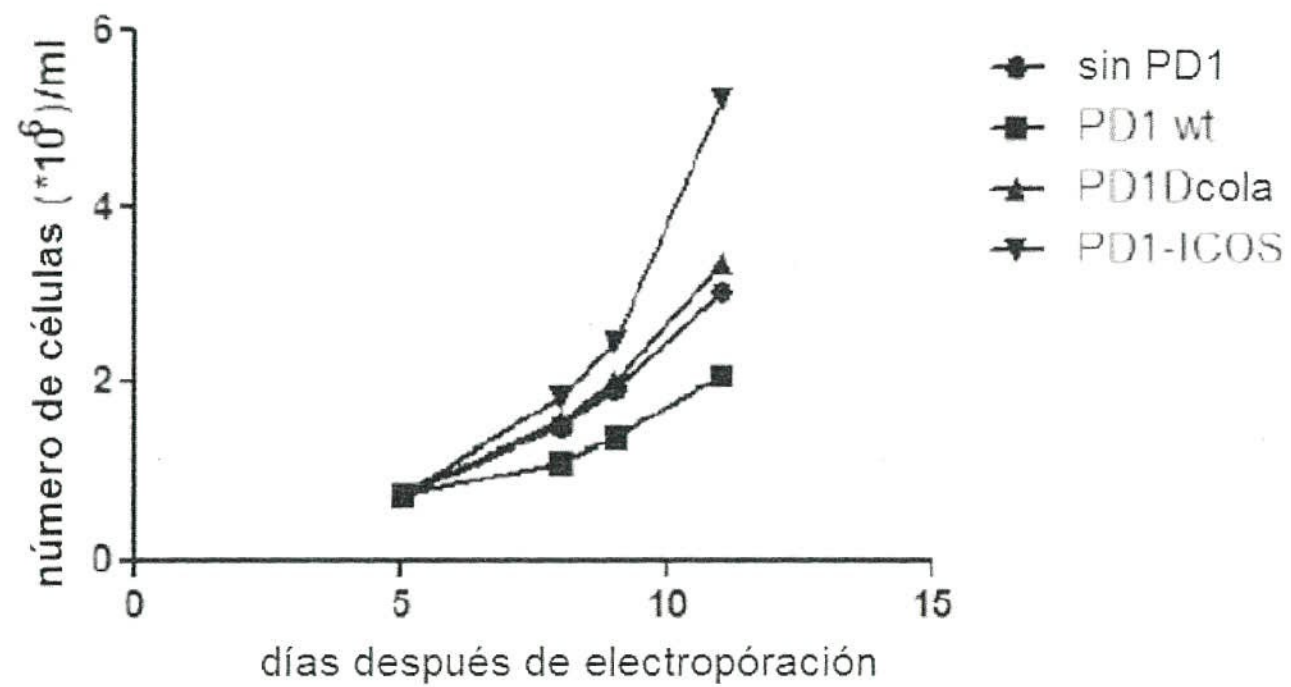
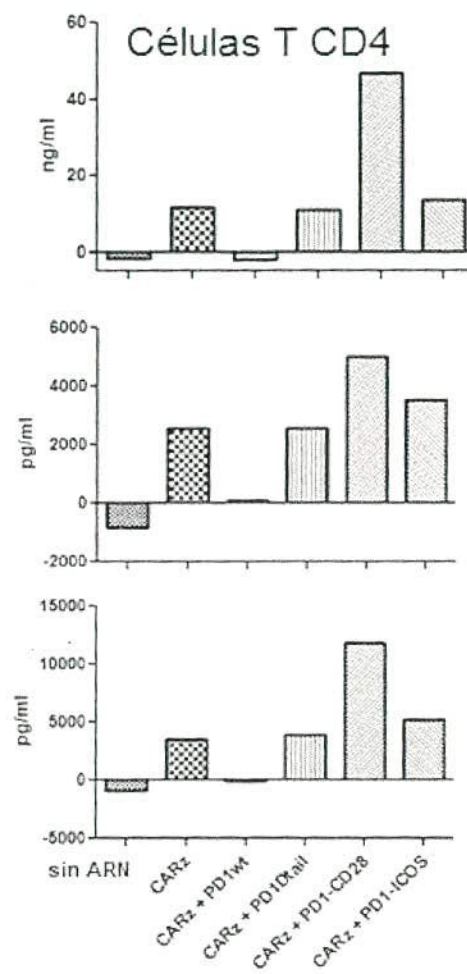
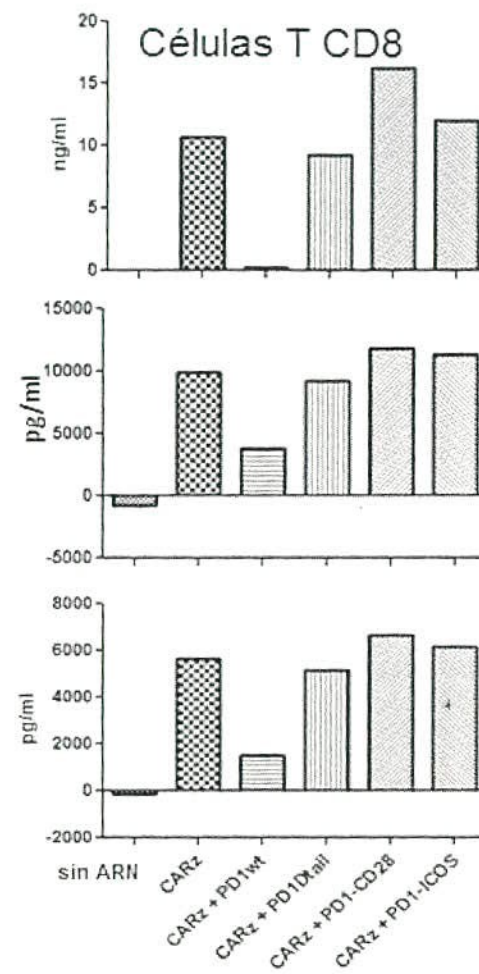


Figura 6C



IL2

IFN γ

TNF α

Figura 7

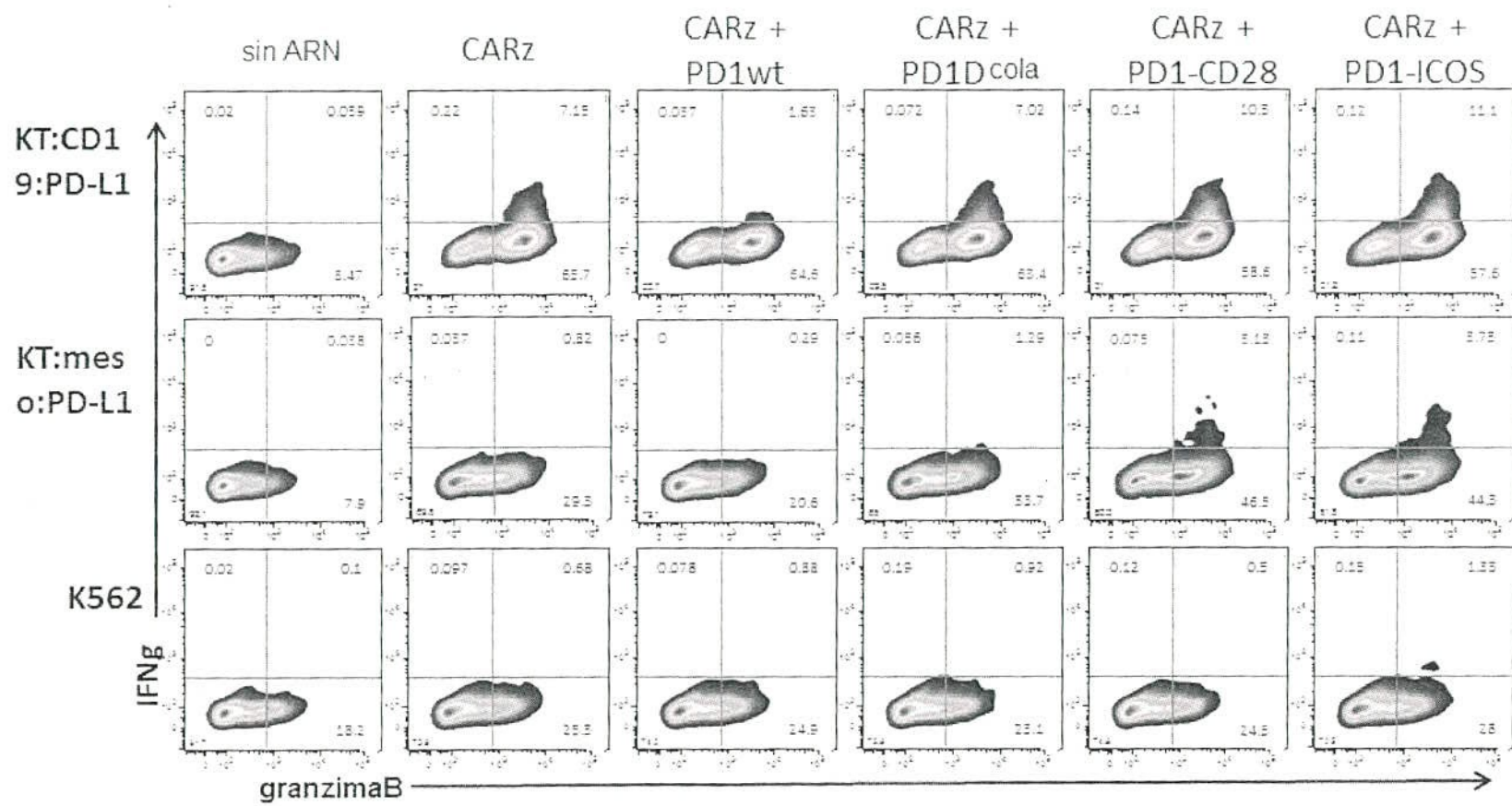


Figura 8

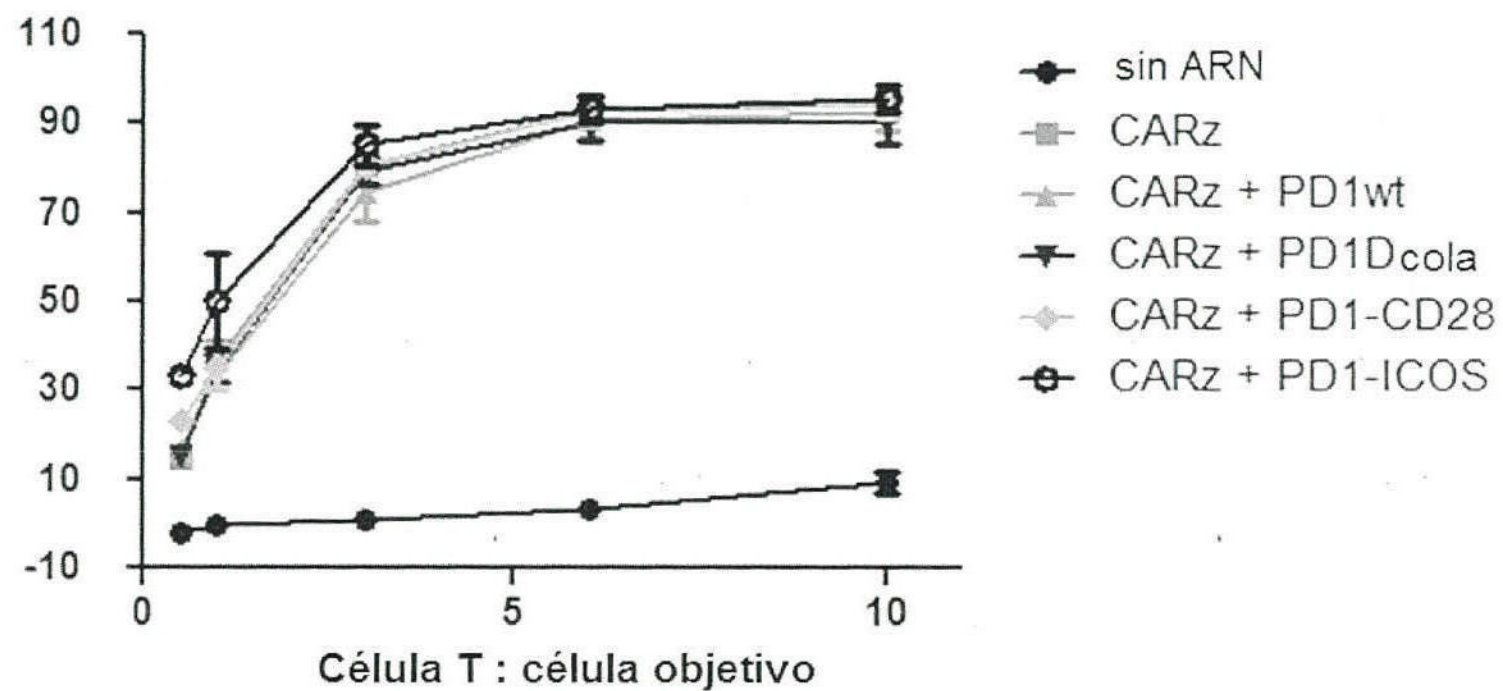
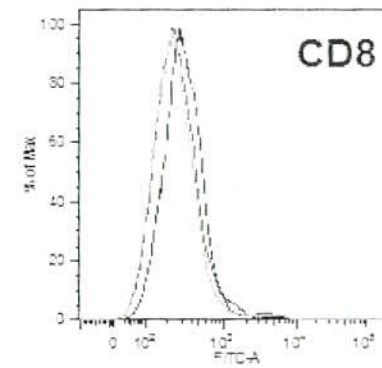
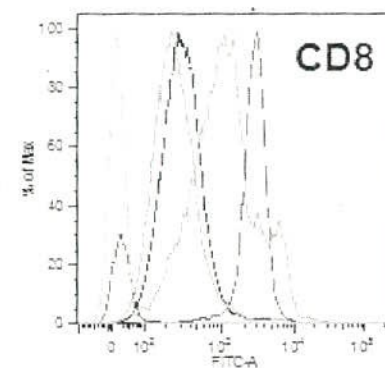
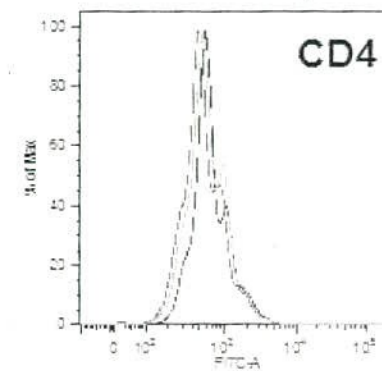
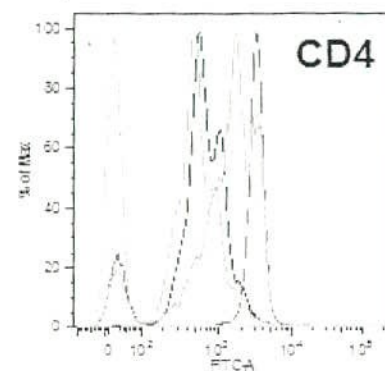
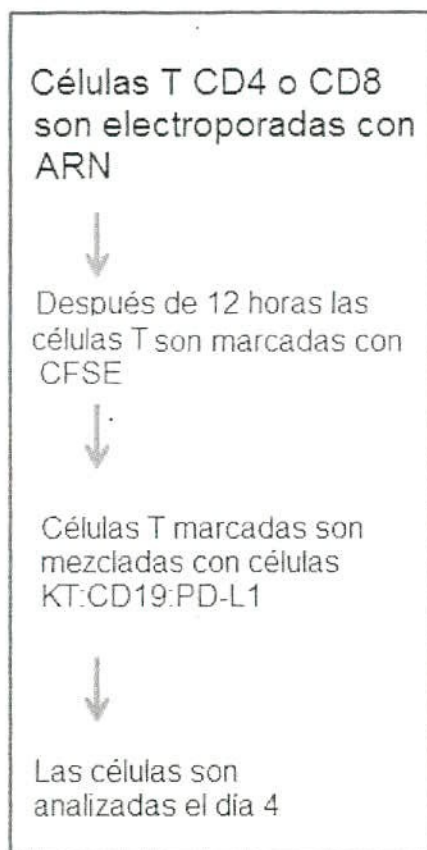


Figura 9



— Células T sin marca CFSE
 - - - CD19CARz + PD1D_{cola}
 - - - CD19CARz + PD1wt
 — CD19CARz
 — Sin ARN

— CD19CARz + PD1-ICOS
 — CD19CARz + PD1-CD28
 — CD19CARz + PD1D_{cola}

Figura 10

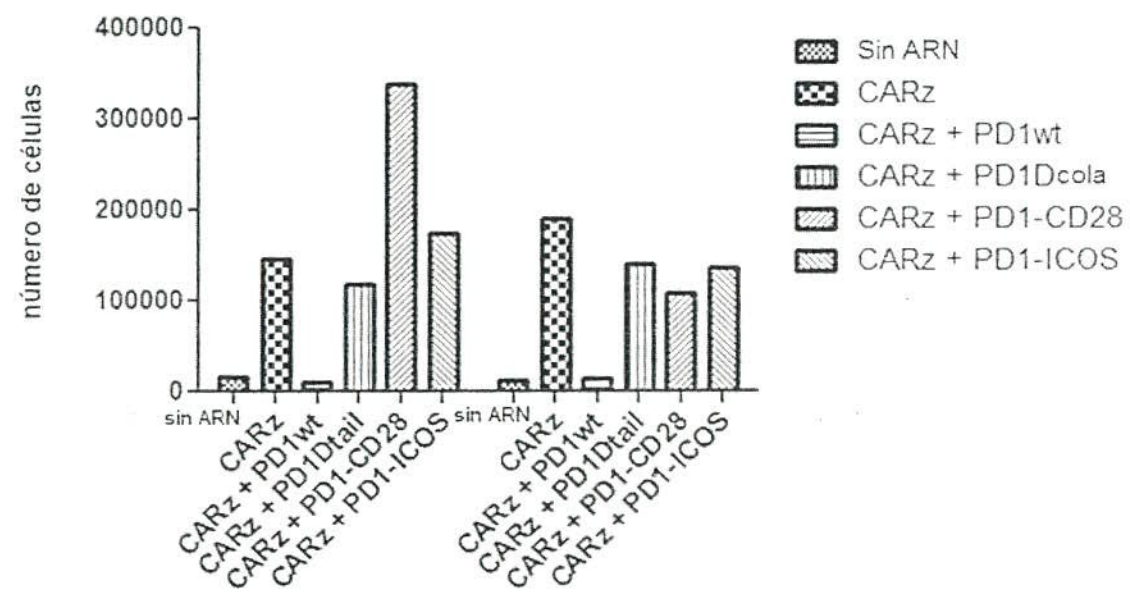


Figura 11

Sequencia
LISTA DE SECUENCIAS

<110> THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA
June, Carl H
Zhao, Yangbing

<120> RECEPTORES COESTIMULADORES DE CAMBIO

<130> 046483-6010-00-WO.601501

<150> US 61/513,259

<151> 2011-07-29

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 870

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> químicamente sintetizado

<400> 1

atgaagacat tgcctgccat gcttggaaact gggaaattat tttgggtctt cttcttaatc	60
ccatatctgg acatctggaa catccatggg aaagaatcat gtgatgtaca gctttatata	120
aagagacaat ctgaacactc catcttagca ggagatccct ttgaactaga atgccctgtg	180
aaatactgtg ctaacaggcc tcatgtgact tgggtgcaagc tcaatggaac aacatgtgta	240
aaacttgaag atagacaaac aagttggaag gaagagaaga acatttcatt tttcattcta	300
cattttgaac cagtgcctcc taatgacaat gggtcatacc gctgttctgc aaattttcag	360
tctaattctca ttgaaagcca ctcaacaact ctttatgtga cagatgtaaa aagtcctca	420
gaacgaccct ccaaggacga aatggcaagc agaccctggc tcctgtatag tttacttcct	480
ttgggggggat tgcctctact catcactacc tgtttctgcc tgttctgctg cctgagaagg	540
caccaaggaa agcaaaatga actctctgac acagcaggaa gggaaattaa cctggttgat	600
gctcaccitaa agagtgaagc aacagaagca agcaccaggc aaaattccca agtactgcta	660
tcagaaactg gaatttatga taatgaccct gacctttgtt tcaggatgca ggaagggctc	720
gaagtttatt ctaatccatg cctggaagaa aacaaaccag gcattgttta tgcttcctg	780
aaccattctg tcattggacc gaactcaaga ctggcaagaa atgtaaaaga agcaccaaca	840
gaatatgcat ccatatgtgt gaggagttaa	870

<210> 2

<211> 685

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> químicamente sintetizado

<400> 2

aagcttgccg ccatgaagac attgcctgcc atgcttggaa ctgggaaatt attttgggtc	60
ttcttcttaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaaagaatc atgtgatgta	120
cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta	180
gaatgccctg tgaaatactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga	240
acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca	300

Sequencia

tttttcattc tacattttga accagtgcct cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct	360
gcaaattttc agtctaattct cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta	420
aaaagtcct cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gctcctgtat	480
agtttacttc ctttgggggg attgcctcta ctcatcacta cctgtttctg cctgttctgc	540
tgcttgagg agtaagagga gcaggctcct gcacagtgcac tacatgaaca tgactccccg	600
ccgccccggg cccaccgcga agcattacca gccctatgcc ccaccacgcg acttcgcagc	660
ctatcgctcc tgataagcgg ccgca	685

<210> 3
 <211> 701
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> químicamente sintetizado

<400> 3 aagcttgccg ccatgaagac attgcctgcc atgcttgga ctgggaaatt attttgggtc	60
ttcttcttaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaaagaatc atgtgatgta	120
cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta	180
gaatgccctg tgaaatactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga	240
acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca	300
tttttcattc tacattttga accagtgcct cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct	360
gcaaattttc agtctaattct cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta	420
aaaagtcct cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gctcctgtat	480
agtttacttc ctttgggggg attgcctcta ctcatcacta cctgtttctg cctgttctgc	540
tgcttggaag gaaatataga tcaaacaaag gagaaagtcc tgtggagcct gcagagcctt	600
gtcgttacag ctgccccagg gaggaggagg gcagcaccat ccccatccag gaggattacc	660
gaaaaccgga gcctgcctgc tccccctgat aagcggccgc a	701

<210> 4
 <211> 685
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> químicamente sintetizado

<400> 4 aagcttgccg ccatgaagac attgcctgcc atgcttgga ctgggaaatt attttgggtc	60
ttcttcttaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaaagaatc atgtgatgta	120
cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta	180
gaatgccctg tgaaatactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga	240
acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca	300
tttttcattc tacattttga accagtgcct cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct	360
gcaaattttc agtctaattct cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta	420
aaaagtcct cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gctcctgtat	480

Sequencia
agtttctggt tacccatagg atgtgcagcc tttgttgtag tctgcatttt gggatgcata 540
cttattgagg agtaagagga gcaggctcct gcacagtgcac tacatgaaca tgactccccg 600
ccgccccggg cccacccgca agcattacca gccctatgcc ccaccacgcg acttcgcagc 660
ctatcgctcc tgataagcgg ccgca 685

<210> 5
<211> 701
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> químicamente sintetizado

<400> 5
aagcttgccg ccatgaagac attgcctgcc atgcttgga ctgggaaatt attttgggtc 60
ttcttcttaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaaagaatc atgtgatgta 120
cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta 180
gaatgccctg tgaaatactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga 240
acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca 300
tttttcattc tacattttga accagtgcct cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct 360
gcaaattttc agtctaactc cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta 420
aaaagtgcct cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gctcctgtat 480
agtttctggt tacccatagg atgtgcagcc tttgttgtag tctgcatttt gggatgcata 540
cttattgaag gaaatataga tcaaacaag gagaaagtcc tgtggagcct gcagagcctt 600
gtcgttacag ctgccccagg gaggaggagg gcagacccat ccccatccag gaggattacc 660
gaaaaccgga gcctgcctgc tccccctgat aagcgccgc a 701

<210> 6
<211> 672
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> químicamente sintetizado

<400> 6
aagcttgccg ccatgaagac attgcctgcc atgcttgga ctgggaaatt attttgggtc 60
ttcttcttaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaaagaatc atgtgatgta 120
cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta 180
gaatgccctg tgaaatactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga 240
acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca 300
tttttcattc tacattttga accagtgcct cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct 360
gcaaattttc agtctaactc cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta 420
aaaagtgcct cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gctcctgtat 480
agtttacttc ctttgggggg attgcctcta ctcatcacta cctgtttctg cctgttctgc 540
tgctgtgtt ggcttacaaa aaagaagtat tcatccagtg tgcacgaccc taacggtgaa 600
tacatgttca tgagagcagt gaacacagcc aaaaaatcta gactcacaga tgtgacccta 660
taagcgccg ca 672

Sequencia

<210> 7
 <211> 1011
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> químicamente sintetizado

<400> 7
 aagcttgccg ccatgaagac attgcctgcc atgcttggaa ctgggaaatt attttgggtc 60
 ttcttcttaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaaagaatc atgtgatgta 120
 cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta 180
 gaatgccctg tgaaatactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga 240
 acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca 300
 tttttcattc tacattttga accagtgcct cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct 360
 gcaaattttc agtctaactc cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta 420
 aaaagtcctc cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gctcctgtat 480
 agtttacttc ctttgggggg attgcctcta ctcatcacta cctgtttctg cctgttctgc 540
 tgcctgtgtt ggcttacaaa aaagaagtat tcatccagtg tgcacgaccc taacggtgaa 600
 tacatgttca tgagagcagt gaacacagcc aaaaaatcta gactcacaga tgtgacccta 660
 tgcagagtga agttcagcag gagcgcagac gccccgcgt accagcaggg ccagaaccag 720
 ctctataacg agctcaatct aggacgaaga gaggagtacg atgttttggg caagagacgt 780
 ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg agaaggaaga accctcagga aggcctgtac 840
 aatgaactgc agaaagataa gatggcggag gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag 900
 cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac 960
 acctacgacg cccttcacat gcaggccctg cccctcgtc aagcggccgc a 1011

<210> 8
 <211> 672
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> químicamente sintetizado

<400> 8
 aagcttgccg ccatgaagac attgcctgcc atgcttggaa ctgggaaatt attttgggtc 60
 ttcttcttaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaaagaatc atgtgatgta 120
 cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta 180
 gaatgccctg tgaaatactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga 240
 acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca 300
 tttttcattc tacattttga accagtgcct cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct 360
 gcaaattttc agtctaactc cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta 420
 aaaagtcctc cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gctcctgtat 480
 agtttctggt taccatagg atgtgcagcc tttgtttag tctgcatttt gggatgcata 540
 cttatttgtt ggcttacaaa aaagaagtat tcatccagtg tgcacgaccc taacggtgaa 600

Sequencia
tacatgtttca tgagagcagt gaacacagcc aaaaaatcta gactcacaga tgtgacccta 660
taagcggccg ca 672

<210> 9
<211> 1011
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> químicamente sintetizado

<400> 9
aagcttgccg ccatgaagac attgcctgcc atgcttggaa ctgggaaatt attttgggtc 60
ttctttcttaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaaagaatc atgtgatgta 120
cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta 180
gaatgccctg tgaaatactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga 240
acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca 300
tttttcattc tacattttga accagtgcct cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct 360
gcaaattttc agtctaattct cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta 420
aaaagtgcct cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gctcctgtat 480
agtttacttc ctttgggggg attgcctcta ctcatcacta cctgtttctg cctgttctgc 540
tgccctgtgtt ggcttacaaa aaagaagtat tcatccagtg tgcacgaccc taacggtgaa 600
tacatgtttca tgagagcagt gaacacagcc aaaaaatcta gactcacaga tgtgacccta 660
tgcagagtga agttcagcag gagcgcagac gccccgcgt accagcaggg ccagaaccag 720
ctctataacg agctcaatct aggacgaaga gaggagtacg atgttttga caagagacgt 780
ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg agaaggaaga accctcagga aggcctgtac 840
aatgaactgc agaaagataa gatggcggag gcctacagt agattgggat gaaaggcgag 900
cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt taccagggc tcagtacagc caccaaggac 960
acctacgacg cccttcacat gcaggccctg cccctcgct aagcgccgc a 1011

<210> 10
<211> 690
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> químicamente sintetizado

<400> 10
atgcagatcc cacaggcgcc ctggccagtc gtctgggagg tgctacaact gggctggcgg 60
ccaggatggt tcttagactc ccagacagc ccctggaacc ccccccactt ctccccagcc 120
ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 180
gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 240
gccttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg 300
cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc 360
tacctctgtg gggccatctc cctggcccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca 420
gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccacccag cccctcacc 480
aggccagccg gccagttcca aaccctggtg ttctggttac ccataggatg tgcagccttt 540

Sequencia

gtttagtct gcattttggg atgcatactt atttgttggc ttacaaaaaa gaagtattca	600
tccagtgtgc acgaccctaa cgggtgaatac atgttcatga gagcagtga cacagccaaa	660
aatctagac tcacagatgt gaccctataa	690

<210> 11
 <211> 717
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> químicamente sintetizado

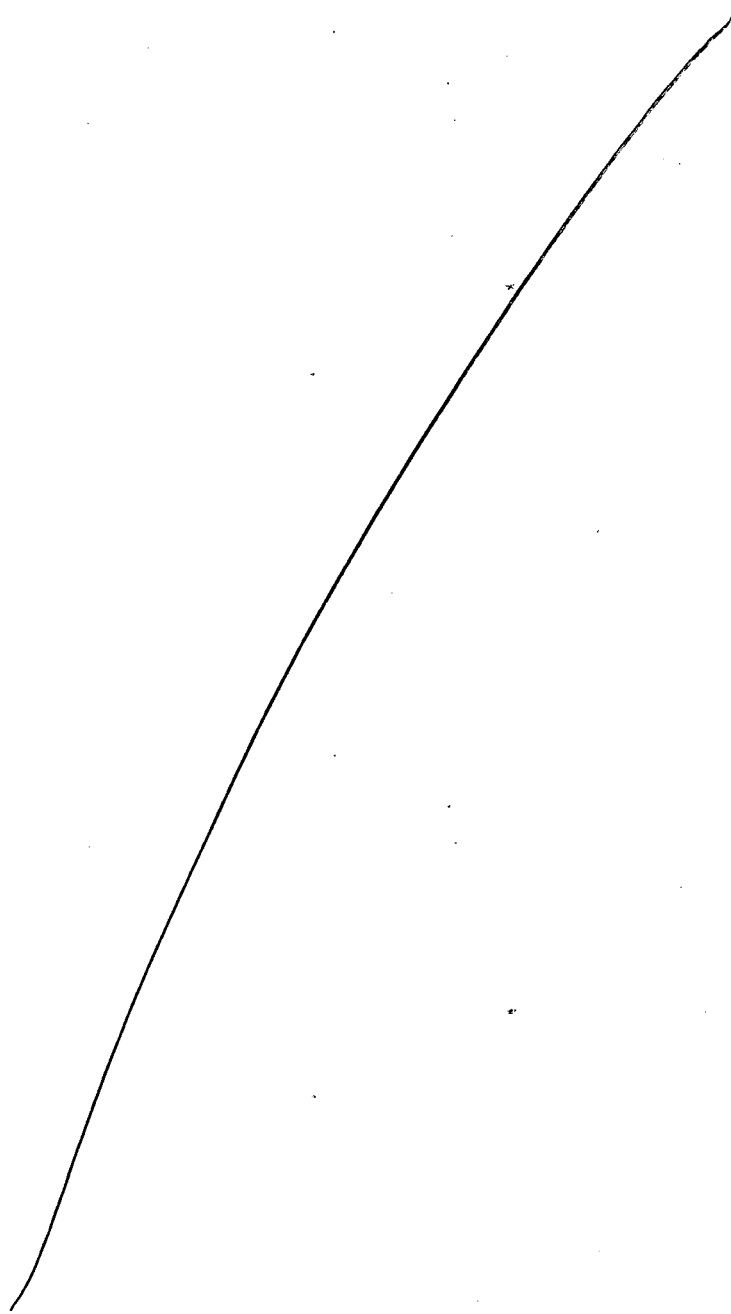
<400> 11 atgcagatcc cacaggcgcc ctggccagtc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg	60
ccaggatggt tcttagactc cccagacagg ccctggaacc cccccacctt ctccccagcc	120
ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg	180
gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc	240
gccttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg	300
cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc	360
tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca	420
gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgccacag cccaccccag cccctcacc	480
aggccagccg gccagttcca aaccctggtg ttttgggtgc tgggtggtgt tgggtggagtc	540
ctggcttgct atagcttgct agtaacagtgc gcctttatta ttttctgggt gaggagtaag	600
aggagcaggc tctgcacag tgactacatg aacatgactc cccgccgccc cgggcccacc	660
cgcaagcatt accagcccta tgccccacca cgcgacttcg cagcctatcg ctcccta	717

<210> 12
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> químicamente sintetizado

<400> 12 atgcagatcc cacaggcgcc ctggccagtc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg	60
ccaggatggt tcttagactc cccagacagg ccctggaacc cccccacctt ctccccagcc	120
ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg	180
gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc	240
gccttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg	300
cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc	360
tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca	420
gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgccacag cccaccccag cccctcacc	480
aggccagccg gccagttcca aaccctggtg atccttgatg tcttctctgg aatgttcctt	540
gttttcaccc tggccggggc cctgttcctc catcaacgaa ggaaatatag atcaaacaaa	600
ggagaaagtc ctgtggagcc tgcagagcct tgtcgttaca gctgccccag ggaggaggag	660
ggcagacca tccccatcca ggaggattac cgaaaaccgg agcctgcctg ctccccctaa	720

Sequencia



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(10) International Publication Number
WO 2013/019615 A2

(43) International Publication Date
7 February 2013 (07.02.2013)

- (51) International Patent Classification:
A61K 48/00 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2012/048543
- (22) International Filing Date:
27 July 2012 (27.07.2012)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/513,259 29 July 2011 (29.07.2011) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA [US/US]; Center For Technology Transfer, 3160 Chestnut Street, Suite 200, Philadelphia, PA 19104-6283 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): JUNE, Carl, H. [US/US]; 409 Baird Road, Merion Station, PA 19066 (US). ZHAO, Yangbing [CN/US]; 23 Doncaster Road, Cherry Hill, NJ 08003 (US).
- (74) Agents: SILVA, Domingos, J. et al.; Riverside Law, LLP, 300 Four Falls Corporate Center, Suite 710, 300 Conshohocken State Road, West Conshohocken, PA 19428 (US).

- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, 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) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (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).

- Published:
- without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))
 - with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: SWITCH COSTIMULATORY RECEPTORS

Fig. 1. Chimeric Receptors

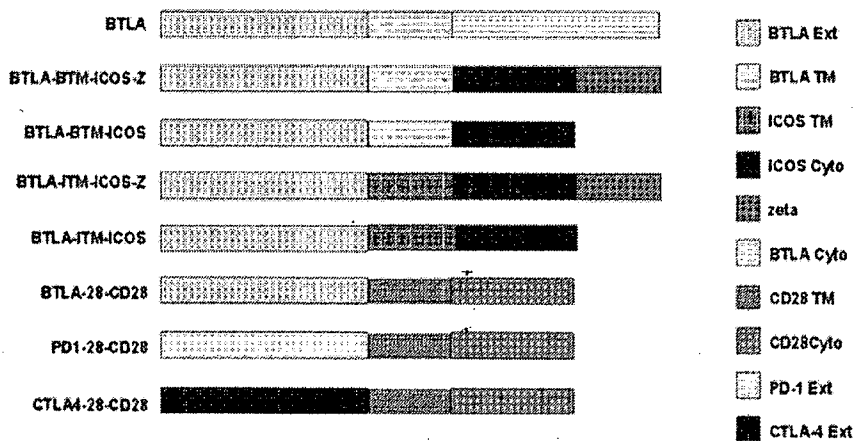


Figure 1A

(57) Abstract: The present invention relates generally to a fusion protein that when displayed on a cell can convert a negative signal into a positive signal in the cell. The fusion protein is a chimeric protein in that the protein comprises at least two domains, wherein the first domain is a polypeptide that is associated with a negative signal and the second domain is a polypeptide that is associated with a positive signal. Thus, the invention encompasses switch receptors that are able to switch negative signals to positive signals for enhancement of an immune response.

TITLE OF THE INVENTION
SWITCH COSTIMULATORY RECEPTORS

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

5 This application claims priority to U.S. Patent Application Serial No. U.S. Patent Application Serial No. 61/513,259, filed July 29, 2011, the contents of which is incorporated by reference herein in its entirety.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10 The general principle of the immune system is that T cells sense their microenvironment, and then either are activated or inhibited, depending on the signals that they sense. The CD28 gene family is comprised of 2 genes that transmit positive signals, CD28 and ICOS, and 3 genes that deliver negative signals: CTLA4, PD-1 and BTLA (Riley et al., 2005, Blood 105:13-21). The ligands for PD-1 are PDL1 and
15 PDL2. It is well known that PD-1 ligands are often expressed in the tumor microenvironment, and that the engagement of PD-1 on T cells by PDL1 or PDL2, can lead to T cell inactivation.

 At this time the only approach to prevent the negative signals delivered by PD-1 or BTLA ligands is to give antagonistic antibodies or fusion proteins that
20 bind to PD-1 or BTLA, an approach that is now being tested in early phase trials (Cheever et al., 2008, Immunol Rev 222:357-68). Another approach would be to give small molecule compounds that might inhibit PD-1 signal transduction or BTLA signal transduction. Current approaches for preventing T cell inactivation by PD-1 is to give systemic treatment to the patient with PD-1 antagonistic antibodies.

25 Both of the above approaches have limitations in that T cells residing in both the tumor microenvironment as well as the entire immune system are prevented from inactivation by the systemic treatment, and this is expected to lead to autoimmunity or systemic inflammatory syndromes in some patients (Beck et al., 2006, J Clin Oncol 24:2283-9; Blansfield et al., 2005, J Immunother 28:593-8;
30 Dougan et al., 2009, Annual Review of Immunology 27:83-117).

 Thus, there is an urgent need in the art for compositions and methods for an effective form of adoptive therapy. The present invention addresses this need.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a fusion protein comprising a first domain and a second domain, wherein the first domain is a polypeptide that is associated with a negative signal and the second domain is a polypeptide that is associated with a positive signal.

In one embodiment, the first domain is at least a portion of the extracellular domain of the polypeptide that is associated with a negative signal and the second domain is at least a portion of the intracellular domain of the polypeptide that is associated with a positive signal.

In one embodiment, the fusion protein further comprises a transmembrane domain. In another embodiment, the transmembrane domain is the transmembrane domain of the polypeptide that is associated with a negative signal or the transmembrane domain of the polypeptide that is associated with a positive signal.

In one embodiment, the polypeptide that is associated with a negative signal is selected from the group consisting of CTLA4, PD-1 and BTLA.

In one embodiment, the polypeptide that is associated with a positive signal is selected from the group consisting of CD28 and ICOS.

The invention also provides a cell engineered to express a fusion protein comprising a first domain and a second domain, wherein the first domain is a polypeptide that is associated with a negative signal and the second domain is a polypeptide that is associated with a positive signal.

In one embodiment, the cell further comprises a chimeric antigen receptor (CAR), wherein the CAR comprises an antigen recognition domain of a specific antibody and an intracellular domain of the CD3-zeta chain.

The invention also provides a vector comprising a first domain and a second domain, wherein the first domain is a polypeptide that is associated with a negative signal and the second domain is a polypeptide that is associated with a positive signal.

The invention provides a method of treating a cancer patient. In one embodiment, the method comprises administering to the patient a T cell genetically engineered to express a fusion protein comprising a first domain and a second domain, wherein the first domain is a polypeptide that is associated with a negative signal and the second domain is a polypeptide that is associated with a positive signal.

In one embodiment, the T cell is further genetically engineered to express a CAR, wherein the CAR comprises an antigen recognition domain of a specific antibody and an intracellular domain of the CD3-zeta chain.

In one embodiment, the T cell is an autologous T cell.

5

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The following detailed description of preferred embodiments of the invention will be better understood when read in conjunction with the appended drawings. For the purpose of illustrating the invention, there are shown in the drawings embodiments which are presently preferred. It should be understood, however, that the invention is not limited to the precise arrangements and instrumentalities of the embodiments shown in the drawings.

Figure 1, comprising Figures 1A through 1C, is a series of images demonstrating that BTLA signal can be converted to other signals in the form of a chimeric co-stimulatory receptor (CCR) or otherwise referred to as a switch receptor. Figure 1A is an image depicting a schematic representation of chimeric switch receptors. Figure 1B is an image demonstrating that surface expression of BTLA was detected by HVEM-Fc fusion protein at different time as indicated. Figure 1C is an image depicting IL-2 produced by electroporated T cells that were either stimulated with BTLA ligand negative cell line (KTPloCD86A2) or BTLA ligand HVEM positive cell line (KTPloCD86A2 HVEM). Twenty-four hours post stimulation, IL-2 production was assayed by ELISA. The results showed that by fusing BTLA extracellular domain with intracellular domains of both ICOS and CD3 zeta, T cells could be activated by stimulation of BTLA ligand HVEM expressing cell line, indication BTLA signal could be converted to other signals in the form of a chimeric co-stimulatory receptor.

Figure 2, comprising Figures 2A through 2C, is a series of images demonstrating that BTLA signal can be converted to CD28 signal through BTLA-CD28 CCR.

Figure 3, comprising Figures 3A and 3B, is a series of images demonstrating that BTLA signal can be converted to ICOS signal through BTLA-ICOS CCR. The results showed that ICOS signal converted from BTLA-ICOS enhanced Th17 cell production.

Figure 4, comprising Figures 4A through 4D, is a series of images demonstrating that PD1 signals can be converted to CD28 signals.

Figure 5, comprising Figures 5A and 5C, is a series of images demonstrating reversal of PD1 inhibition by PD1-CD28 CCR co-introduction.

5 Figure 6, comprising Figures 6A through 6C, is a series of images demonstrating conversion of PD1 signal into ICOS signal.

Figure 7 is an image demonstrating that the inhibitory effect of PD1wt on cytokine production is rescued by PD1 chimeric constructs.

10 Figure 8 is an image-demonstrating that PD-1 chimeric receptors do not affect granzymeB production.

Figure 9 is an image demonstrating that minimal differences were observed in the killing activity of CD8 T cells in the presence or absence of PD1.

Figure 10 is an image showing the effect of PD-1 chimeric receptors on T cell proliferation.

15 Figure 11 is an image showing that PD1-CD28 chimeric receptor increases the number of CD8 T cells.

DETAILED DESCRIPTION

20 The present invention relates generally to a fusion protein receptor that when displayed on a cell can convert a negative signal into a positive signal to the cell. The fusion protein is a chimeric protein in that the protein comprises at least two domains, wherein the first domain is a polypeptide that is associated with a negative signal and the second domain is a polypeptide that is associated with a positive signal. In one embodiment, the first domain binds to an inhibitory factor and activates the
25 fusion protein wherein the signal is sent through the second domain resulting in a positive signal transmitted to the cell. In this manner, the fusion protein is able to convert an otherwise negative signal into a positive signal in the cell. Thus, the invention can be considered to encompass switch receptors that are able to switch negative signals to positive signals for enhancement of an immune response. The
30 enhancement of an immune response can treat a disease associated with an inadequate immune response.

The invention is based on the discovery that T cells can be engineered to express a switch receptor in order to take advantage of the fact that T cells are able to sense their microenvironment to either be activated or inhibited depending on the

signals that they sense. For example, the present invention takes advantage of the fact there are ligands present in the tumor microenvironment that inhibit the activity of T cells. T cells are engineered to express a switch receptor wherein the first domain is able to be activated by the inhibitory ligands in the tumor microenvironment and
5 switch the otherwise inhibitory signal into a positive signal to the T cell byway of signaling through the second domain of the switch receptor. Thus, the invention provides a therapy that provides an improved therapeutic index with less toxicity as well as the ability to provide a one-time treatment that is effective, and avoids the need for the continuing administration of antibodies.

10 In some instances, the cells are genetically modified prior to administering them to a patient in need thereof. Preferably, the cell can be genetically modified to stably express a desired switch receptor of the invention. In other instances, the cells can be further modified to express an antibody binding domain on its surface, conferring novel antigen specificity that is MHC independent (e.g.,
15 chimeric antigen receptors (CAR)). CAR combines an antigen recognition domain of a specific antibody with an intracellular domain of the CD3-zeta chain or FcγRI protein into a single chimeric protein. In this context, the cell is engineered to express both a switch receptor and a CAR.

The modified cells of the invention are able to replicate *in vivo*
20 resulting in long-term persistence that can lead to sustained tumor control.

The present invention further provides methods for making the present switch receptors, and methods for using these switch receptors in the study and treatment of cancer.

25 Definitions

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which the invention pertains. Although any methods and materials similar or
equivalent to those described herein can be used in the practice for testing of the
30 present invention, the preferred materials and methods are described herein. In describing and claiming the present invention, the following terminology will be used.

It is also to be understood that the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments only, and is not intended to be limiting.

The articles "a" and "an" are used herein to refer to one or to more than one (*i.e.*, to at least one) of the grammatical object of the article. By way of example, "an element" means one element or more than one element.

"About" as used herein when referring to a measurable value such as an amount, a temporal duration, and the like, is meant to encompass variations of $\pm 20\%$ or $\pm 10\%$, more preferably $\pm 5\%$, even more preferably $\pm 1\%$, and still more preferably $\pm 0.1\%$ from the specified value, as such variations are appropriate to perform the disclosed methods.

The term "antibody," as used herein, refers to an immunoglobulin molecule which specifically binds with an antigen. Antibodies can be intact immunoglobulins derived from natural sources or from recombinant sources and can be immunoreactive portions of intact immunoglobulins. Antibodies are typically tetramers of immunoglobulin molecules. The antibodies in the present invention may exist in a variety of forms including, for example, polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, Fv, Fab and F(ab)₂, as well as single chain antibodies and humanized antibodies (Harlow 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).

The term "antigen" or "Ag" as used herein is defined as a molecule that provokes an immune response. This immune response may involve either antibody production, or the activation of specific immunologically-competent cells, or both. The skilled artisan will understand that any macromolecule, including virtually all proteins or peptides, can serve as an antigen. Furthermore, antigens can be derived from recombinant or genomic DNA. A skilled artisan will understand that any DNA, which comprises a nucleotide sequence or a partial nucleotide sequence encoding a protein that elicits an immune response therefore encodes an "antigen" as that term is used herein. Furthermore, one skilled in the art will understand that an antigen need not be encoded solely by a full length nucleotide sequence of a gene. It is readily apparent that the present invention includes, but is not limited to, the use of partial nucleotide sequences of more than one gene and that these nucleotide sequences are arranged in various combinations to elicit the desired immune response. Moreover, a skilled artisan will understand that an antigen need not be encoded by a "gene" at all. It is readily apparent that an antigen can be generated synthesized or can be derived

from a biological sample. Such a biological sample can include, but is not limited to a tissue sample, a tumor sample, a cell or a biological fluid.

The term "anti-tumor effect" as used herein, refers to a biological effect which can be manifested by a decrease in tumor volume, a decrease in the number of tumor cells, a decrease in the number of metastases, an increase in life expectancy, or amelioration of various physiological symptoms associated with the cancerous condition. An "anti-tumor effect" can also be manifested by the ability of the peptides, polynucleotides, cells and antibodies of the invention in prevention of the occurrence of tumor in the first place.

As used herein, the term "autologous" can be used to refer to any material derived from the same individual to which it is later to be re-introduced into the individual.

"Allogeneic" refers to a graft derived from a different animal of the same species.

"Xenogeneic" refers to a graft derived from an animal of a different species.

As used herein, "biologically active or immunologically active" refers to fusion proteins according to the present invention having a similar structural function (but not necessarily to the same degree), and/or similar regulatory function (but not necessarily to the same degree), and/or similar biochemical function (but not necessarily to the same degree) and/or immunological activity (but not necessarily to the same degree) as the individual wild type proteins which are the building blocks of the fusion proteins of the present invention.

The term "cancer" as used herein is defined as disease characterized by the rapid and uncontrolled growth of aberrant cells. Cancer cells can spread locally or through the bloodstream and lymphatic system to other parts of the body. Examples of various cancers include but are not limited to, breast cancer, prostate cancer, ovarian cancer, cervical cancer, skin cancer, pancreatic cancer, colorectal cancer, renal cancer, liver cancer, brain cancer, lymphoma, leukemia, lung cancer and the like.

By "chimeric protein" is meant any single polypeptide unit that comprises two distinct polypeptide domains, wherein the two domains are not naturally occurring within the same polypeptide unit. Typically, such chimeric

proteins are made by expression of a cDNA construct but could be made by protein synthesis methods known in the art.

The term “derivative” as used herein in relation to the amino acid sequence means chemical modification of a fusion protein of the invention.

5 “Encoding” refers to the inherent property of specific sequences of nucleotides in a polynucleotide, such as a gene, a cDNA, or an mRNA, to serve as templates for synthesis of other polymers and macromolecules in biological processes having either a defined sequence of nucleotides (*i.e.*, rRNA, tRNA and mRNA) or a defined sequence of amino acids and the biological properties resulting therefrom.

10 Thus, a gene encodes a protein if transcription and translation of mRNA corresponding to that gene produces the protein in a cell or other biological system. Both the coding strand, the nucleotide sequence of which is identical to the mRNA sequence and is usually provided in sequence listings, and the non-coding strand, used as the template for transcription of a gene or cDNA, can be referred to as encoding the

15 protein or other product of that gene or cDNA.

Unless otherwise specified, a “nucleotide sequence encoding an amino acid sequence” includes all nucleotide sequences that are degenerate versions of each other and that encode the same amino acid sequence. Nucleotide sequences that encode proteins and RNA may include introns.

20 “Effective amount” or “therapeutically effective amount” are used interchangeably herein, and refer to an amount of a compound, formulation, material, or composition, as described herein effective to achieve a particular biological result. Such results may include, but are not limited to, the inhibition of virus infection as determined by any means suitable in the art.

25 As used herein “endogenous” refers to any material from or produced inside an organism, cell, tissue or system.

As used herein, the term “exogenous” refers to any material introduced from or produced outside an organism, cell, tissue or system.

30 The term “expression” as used herein is defined as the transcription and/or translation of a particular nucleotide sequence driven by its promoter.

“Expression vector” refers to a vector comprising a recombinant polynucleotide comprising expression control sequences operatively linked to a nucleotide sequence to be expressed. An expression vector comprises sufficient cis-acting elements for expression; other elements for expression can be supplied by the

host cell or in an in vitro expression system. Expression vectors include all those known in the art, such as cosmids; plasmids (*e.g.*, naked or contained in liposomes) and viruses (*e.g.*, lentiviruses, retroviruses, adenoviruses, and adeno-associated viruses) that incorporate the recombinant polynucleotide.

5 As used herein, the term “fusion proteins” refers to chimeric proteins comprising amino acid sequences of two or more different proteins. Typically, fusion proteins result from in vitro recombinatory techniques well known in the art.

 “Homologous” as used herein, refers to the subunit sequence identity between two polymeric molecules, *e.g.*, between two nucleic acid molecules, such as,
10 two DNA molecules or two RNA molecules, or between two polypeptide molecules. When a subunit position in both of the two molecules is occupied by the same monomeric subunit; *e.g.*, if a position in each of two DNA molecules is occupied by adenine, then they are homologous at that position. The homology between two sequences is a direct function of the number of matching or homologous positions;
15 *e.g.*, if half (*e.g.*, five positions in a polymer ten subunits in length) of the positions in two sequences are homologous, the two sequences are 50% homologous; if 90% of the positions (*e.g.*, 9 of 10), are matched or homologous, the two sequences are 90% homologous.

 By the term “immune reaction,” as used herein, is meant the detectable
20 result of stimulating and/or activating an immune cell.

 “Immune response,” as the term is used herein, means a process that results in the activation and/or invocation of an effector function in either the T cells, B cells, natural killer (NK) cells, and/or antigen-presenting cells. Thus, an immune response, as would be understood by the skilled artisan, includes, but is not limited to,
25 any detectable antigen-specific or allogeneic activation of a helper T cell or cytotoxic T cell response, production of antibodies, T cell-mediated activation of allergic reactions, and the like.

 “Immune cell,” as the term is used herein, means any cell involved in the mounting of an immune response. Such cells include, but are not limited to, T
30 cells, B cells, NK cells, antigen-presenting cells, and the like.

 As used herein, an “instructional material” includes a publication, a recording, a diagram, or any other medium of expression which can be used to communicate the usefulness of the compositions and methods of the invention. The instructional material of the kit of the invention may, for example, be affixed to a

container which contains the nucleic acid, peptide, and/or composition of the invention or be shipped together with a container which contains the nucleic acid, peptide, and/or composition. Alternatively, the instructional material may be shipped separately from the container with the intention that the instructional material and the
5 compound be used cooperatively by the recipient.

“Isolated” means altered or removed from the natural state. For example, a nucleic acid or a peptide naturally present in a living animal is not “isolated,” but the same nucleic acid or peptide partially or completely separated from the coexisting materials of its natural state is “isolated.” An isolated nucleic acid or
10 protein can exist in substantially purified form, or can exist in a non-native environment such as, for example, a host cell.

In the context of the present invention, the following abbreviations for the commonly occurring nucleic acid bases are used. “A” refers to adenosine, “C” refers to cytosine, “G” refers to guanosine, “T” refers to thymidine, and “U” refers to
15 uridine.

Unless otherwise specified, a “nucleotide sequence encoding an amino acid sequence” includes all nucleotide sequences that are degenerate versions of each other and that encode the same amino acid sequence. The phrase nucleotide sequence that encodes a protein or an RNA may also include introns to the extent that the
20 nucleotide sequence encoding the protein may in some version contain an intron(s).

A “lentivirus” as used herein refers to a genus of the Retroviridae family. Lentiviruses are unique among the retroviruses in being able to infect non-dividing cells; they can deliver a significant amount of genetic information into the DNA of the host cell, so they are one of the most efficient methods of a gene delivery
25 vector. HIV, SIV, and FIV are all examples of lentiviruses. Vectors derived from lentiviruses offer the means to achieve significant levels of gene transfer in vivo.

By the term “modulating” an immune response, as used herein, is meant mediating a detectable increase or decrease in the level of an immune response in a mammal compared with the level of an immune response in the mammal in the
30 absence of a treatment or compound, and/or compared with the level of an immune response in an otherwise identical but untreated mammal. The term encompasses perturbing and/or affecting a native signal or response thereby mediating a beneficial therapeutic response in a mammal, preferably, a human.

“Negative signal”, as used herein, means a signal that induces the

typical cascade of intracellular events associated with among other things, decrease proliferation, decrease activation, decrease cellular processing, and the like.

“Positive signal”, as used herein, means a signal that induces the typical cascade of intracellular events associated with among other things increase, proliferation, increase activation, increase cellular processing, and the like.

The term “operably linked” refers to functional linkage between a regulatory sequence and a heterologous nucleic acid sequence resulting in expression of the latter. For example, a first nucleic acid sequence is operably linked with a second nucleic acid sequence when the first nucleic acid sequence is placed in a functional relationship with the second nucleic acid sequence. For instance, a promoter is operably linked to a coding sequence if the promoter affects the transcription or expression of the coding sequence. Generally, operably linked DNA sequences are contiguous and, where necessary to join two protein coding regions, in the same reading frame.

“Parenteral” administration of an immunogenic composition includes, *e.g.*, subcutaneous (s.c.), intravenous (i.v.), intramuscular (i.m.), or intrasternal injection, or infusion techniques.

The term “polynucleotide” as used herein is defined as a chain of nucleotides. Furthermore, nucleic acids are polymers of nucleotides. Thus, nucleic acids and polynucleotides as used herein are interchangeable. One skilled in the art has the general knowledge that nucleic acids are polynucleotides, which can be hydrolyzed into the monomeric “nucleotides.” The monomeric nucleotides can be hydrolyzed into nucleosides. As used herein polynucleotides include, but are not limited to, all nucleic acid sequences which are obtained by any means available in the art, including, without limitation, recombinant means, *i.e.*, the cloning of nucleic acid sequences from a recombinant library or a cell genome, using ordinary cloning technology and PCR™, and the like, and by synthetic means.

As used herein, the terms “peptide,” “polypeptide,” and “protein” are used interchangeably, and refer to a compound comprised of amino acid residues covalently linked by peptide bonds. A protein or peptide must contain at least two amino acids, and no limitation is placed on the maximum number of amino acids that can comprise a protein’s or peptide’s sequence. Polypeptides include any peptide or protein comprising two or more amino acids joined to each other by peptide bonds. As used herein, the term refers to both short chains, which also commonly are referred

to in the art as peptides, oligopeptides and oligomers, for example, and to longer chains, which generally are referred to in the art as proteins, of which there are many types. "Polypeptides" include, for example, biologically active fragments, substantially homologous polypeptides, oligopeptides, homodimers, heterodimers, 5 variants of polypeptides, modified polypeptides, derivatives, analogs, fusion proteins, among others. The polypeptides include natural peptides, recombinant peptides, synthetic peptides, or a combination thereof.

The term "promoter" as used herein is defined as a DNA sequence recognized by the synthetic machinery of the cell, or introduced synthetic machinery, 10 required to initiate the specific transcription of a polynucleotide sequence.

As used herein, the term "promoter/regulatory sequence" means a nucleic acid sequence which is required for expression of a gene product operably linked to the promoter/regulatory sequence. In some instances, this sequence may be the core promoter sequence and in other instances, this sequence may also include an 15 enhancer sequence and other regulatory elements which are required for expression of the gene product. The promoter/regulatory sequence may, for example, be one which expresses the gene product in a tissue specific manner.

A "constitutive" promoter is a nucleotide sequence which, when operably linked with a polynucleotide which encodes or specifies a gene product, 20 causes the gene product to be produced in a cell under most or all physiological conditions of the cell.

An "inducible" promoter is a nucleotide sequence which, when operably linked with a polynucleotide which encodes or specifies a gene product, causes the gene product to be produced in a cell substantially only when an inducer 25 which corresponds to the promoter is present in the cell.

A "tissue-specific" promoter is a nucleotide sequence which, when operably linked with a polynucleotide encodes or specified by a gene, causes the gene product to be produced in a cell substantially only if the cell is a cell of the tissue type corresponding to the promoter.

30 The term "subject" is intended to include living organisms in which an immune response can be elicited (e.g., mammals).

As used herein, a "substantially purified" cell is a cell that is essentially free of other cell types. A substantially purified cell also refers to a cell which has been separated from other cell types with which it is normally associated in

its naturally occurring state. In some instances, a population of substantially purified cells refers to a homogenous population of cells. In other instances, this term refers simply to cell that have been separated from the cells with which they are naturally associated in their natural state. In some embodiments, the cells are cultured *in vitro*.

5 In other embodiments, the cells are not cultured *in vitro*.

The term "therapeutic" as used herein means a treatment and/or prophylaxis. A therapeutic effect is obtained by suppression, remission, or eradication of a disease state.

The term "transfected" or "transformed" or "transduced" as used
10 herein refers to a process by which exogenous nucleic acid is transferred or introduced into the host cell. A "transfected" or "transformed" or "transduced" cell is one which has been transfected, transformed or transduced with exogenous nucleic acid. The cell includes the primary subject cell and its progeny.

The phrase "under transcriptional control" or "operatively linked" as
15 used herein means that the promoter is in the correct location and orientation in relation to a polynucleotide to control the initiation of transcription by RNA polymerase and expression of the polynucleotide.

A "vector" is a composition of matter which comprises an isolated nucleic acid and which can be used to deliver the isolated nucleic acid to the interior
20 of a cell. Numerous vectors are known in the art including, but not limited to, linear polynucleotides, polynucleotides associated with ionic or amphiphilic compounds, plasmids, and viruses. Thus, the term "vector" includes an autonomously replicating plasmid or a virus. The term should also be construed to include non-plasmid and non-viral compounds which facilitate transfer of nucleic acid into cells, such as, for
25 example, polylysine compounds, liposomes, and the like. Examples of viral vectors include, but are not limited to, adenoviral vectors, adeno-associated virus vectors, retroviral vectors, and the like.

By the term "stimulation," is meant a primary response induced by binding of a stimulatory molecule (*e.g.*, a TCR/CD3 complex) with its cognate ligand
30 thereby mediating a signal transduction event, such as, but not limited to, signal transduction via the TCR/CD3 complex. Stimulation can mediate altered expression of certain molecules, such as downregulation of TGF- β , and/or reorganization of cytoskeletal structures, and the like.

“Activation”, as used herein, refers to the state of a T cell that has been sufficiently stimulated to induce detectable cellular proliferation. Activation can also be associated with induced cytokine production, and detectable effector functions. The term “activated T cells” refers to, among other things, T cells that are undergoing cell division. Activation can also be associated with generating an immune response (e.g., a mitogen such as ConA or PHA), detectably upregulates surface markers, such as CD25, i.e., the IL2 receptor, initiates a phosphorylation cascade involving p56lck, causes the release of cytokines and interleukins, increases DNA synthesis which can be assessed by, among other methods, assessing the level of incorporation of ³H-thymidine into nascent DNA strands, and causes the cells to proliferate.

By the term “specifically binds,” as used herein, is meant an antibody, or a ligand, which recognizes and binds with a cognate binding partner (e.g., a stimulatory and/or costimulatory molecule present on a T cell) protein present in a sample, but which antibody or ligand does not substantially recognize or bind other molecules in the sample.

Ranges: throughout this disclosure, various aspects of the invention can be presented in a range format. It should be understood that the description in range format is merely for convenience and brevity and should not be construed as an inflexible limitation on the scope of the invention. Accordingly, the description of a range should be considered to have specifically disclosed all the possible subranges as well as individual numerical values within that range. For example, description of a range such as from 1 to 6 should be considered to have specifically disclosed subranges such as from 1 to 3, from 1 to 4, from 1 to 5, from 2 to 4, from 2 to 6, from 3 to 6 etc., as well as individual numbers within that range, for example, 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3, and 6. This applies regardless of the breadth of the range.

Description

The present invention relates to the discovery that a chimeric switch receptor can be designed to switch a negative signal transduction signal into a positive signal. In one embodiment, the switch receptor is a chimeric protein comprising a first protein or fragment thereof associated with a negative signal and a second protein or fragment thereof associated with a positive signal. An example of a protein associated with a negative signal includes but is not limited to CTLA-4, PD-1, BTLA,

and the like. An example of a protein associated with a positive signal includes but is not limited to CD28, ICOS, and the like.

The invention relates to chimeric switch receptors and related fusion proteins, and methods of treating cancer with these proteins.

5 In one embodiment, the invention provides a cell (e.g., T cell or natural killer cell) engineered to express a chimeric switch receptor wherein the engineered cell exhibits an antitumor property. In some instances, the engineered cell is also engineered to express a chimeric antigen receptor (CAR). In some instances, the engineered cell of the invention exhibits enhanced IL-2 and IFN- γ production. In
10 some instances, the engineered cell of the invention is polarized to secrete IL-17. Therefore, the engineered cell of the invention when infused into a patient can eliminate tumor cells *in vivo* in the patient.

Compositions

15 The present invention provides, in one aspect, a switch receptor which when expressed in a cell converts a negative signal into a positive signal in the cell. For example, this switch receptor has a first domain that comprises a polypeptide that delivers a negative signal; and a second domain that comprises a polypeptide that delivers a positive signal.

20 In one embodiment, a polypeptide that has the capacity to deliver a negative signal includes but is not limited to CTLA4, PD-1, BTLA, and the like.

In one embodiment, a polypeptide that has the capacity to deliver a positive signal includes but is not limited to ICOS, CD28, and the like.

Suitable first domains in the context of a polypeptide that delivers a
25 negative signal include, variants or derivatives of wild-type CTLA4. Preferably, the first domain of the switch receptor of this embodiment is at least a portion of the extracellular domain of the CTLA protein, specifically that portion of the extracellular domain which is necessary for binding to the natural ligand of CTLA. Variants of the wild-type form of the extracellular domain, or the portion of the extracellular domain
30 responsible for binding to the natural ligand of CTLA, are also included in the present invention, so long as the variant provides a similar level of biological activity as the wild-type protein.

Suitable first domains in the context of a polypeptide that delivers a negative signal include, variants or derivatives of wild-type PD-1. Preferably, the first domain of the switch receptor of this embodiment is at least a portion of the extracellular domain of the PD-1 protein, specifically that portion of the extracellular domain which is necessary for binding to the natural ligand of PD-1. Variants of the wild-type form of the extracellular domain, or the portion of the extracellular domain responsible for binding to the natural ligand of PD-1, are also included in the present invention, so long as the variant provides a similar level of biological activity as the wild-type protein.

10 Suitable first domains in the context of a polypeptide that delivers a negative signal include, variants or derivatives of wild-type BTLA. Preferably, the first domain of the switch receptor of this embodiment is at least a portion of the extracellular domain of the BTLA protein, specifically that portion of the extracellular domain which is necessary for binding to the natural ligand of BTLA. Variants of the wild-type form of the extracellular domain, or the portion of the extracellular domain responsible for binding to the natural ligand of BTLA, are also included in the present invention, so long as the variant provides a similar level of biological activity as the wild-type protein.

20 Suitable second domains in the context of a polypeptide that delivers a positive signal include, variants or derivatives of the ICOS protein. Preferably, the second domain of the switch receptor in this embodiment is at least a portion of the intracellular domain (also referred to as endodomain) of the ICOS protein, specifically that portion which is necessary for triggering a signal to intracellular components of the cell. Variants of the wild-type form of the intracellular domain of the ICOS protein, or the portion of the intracellular domain responsible for signaling, are also included in the present invention, so long as the variant provides a similar level of biological activity as the wild-type protein.

30 Suitable second domains in the context of a polypeptide that delivers a positive signal include, variants or derivatives of the CD28 protein. Preferably, the second domain of the switch receptor in this embodiment is at least a portion of the intracellular domain (also referred to as endodomain or cytoplasmic) of the CD28 protein, specifically that portion which is necessary for triggering a signal to intracellular components of the cell. Variants of the wild-type form of the intracellular domain of the CD28 protein, or the portion of the intracellular domain

responsible for signaling, are also included in the present invention, so long as the variant provides a similar level of biological activity as the wild-type protein.

The switch receptor of the invention comprises a polypeptide corresponding to a cytoplasmic, transmembrane and extracellular domain, as well as
5 polypeptides corresponding to smaller portions of the cytoplasmic, transmembrane and extracellular domain. In one embodiment the switch receptor comprises the transmembrane domain of the first polypeptide that delivers a negative signal. In another embodiment, the switch receptor comprises the transmembrane domain of the second polypeptide that delivers a positive signal.

10 In yet an additional aspect of the present invention, the first polypeptide that delivers a negative signal component of any of the switch receptors described herein can be substituted with another inhibitory protein, i.e. a protein which prevents activation of an immune response and/or induces apoptosis in T cells or other cell types, such as B cells, natural killer (NK) cells, NKT cells, lymphoid
15 progenitor cells, dendritic cells, monocytes/macrophages, tissue-based macrophage lineage cells with antigen-presenting capacity, and any one of a number of non-professional antigen-presenting cells, for example, endothelial cells. Examples of inhibitory proteins include, but are not limited to ligands to PD-1, CTLA-4, BTLA, CD160, CD161 and CD94; LAG-3, and CD244 (see 2011, Wherry, Nat Immunol.
20 131:492-9).

Any suitable first polypeptide that delivers a negative signal can be used according to the present invention, provided the polypeptide binds to the corresponding ligand, and through this binding event leads to a activation of the switch receptor. According to one embodiment of the present invention, the
25 engagement of the first polypeptide that delivers a negative signal of the switch receptor with its corresponding ligand results in the activation of the second polypeptide that delivers a positive signal of the switch receptor. In this manner, a negative signal can be converted to a positive signal. That is, the first polypeptide of the switch receptor of the present invention can trigger an intracellular signaling
30 pathway whereby the activation of the second polypeptide of the invention results in the conversion of the negative signal into a positive signal. Thus, a unique feature of the first polypeptide of the switch receptor of the present invention is that it converts a natural trans signal that naturally would result in a negative signal to the cell into a positive signal that induces the cell to exhibit antitumor characteristics.

Similarly, any suitable second polypeptide can be used, provided the protein can send a positive signal to a cell, that is distinct from the trans signal associated with the first polypeptide component of the switch receptor. The second polypeptide can be a protein that sends a positive signal or an activating signal. A preferred example of the second polypeptide of the invention includes but is not limited to CD28, CD27, ICOS, CD137 (4-1BB), and TCRzeta.

In one embodiment, the invention takes advantage of microenvironments where there is a large number of ligands or proteins that inhibit the immune system wherein inhibition of the immune system results in an undesirable disease state. That is, the switch receptor can be engineered to comprise a first domain that binds to the immune inhibitory factor in the microenvironment and converts the signal normally associated with the immune inhibitory factor into a positive signal where the positive signal activates the cell to exhibit an enhanced immune response.

A preferred chimeric protein of the present invention is BTLA:ICOS. Genetic chimerization of BTLA with ICOS sequences and recombinant expression results in chimeric BTLA:ICOS "switch receptor" that demonstrate structural and functional characteristics attributable to both BTLA and ICOS. Cells engineered to express BTLA: ICOS can redirect inhibitory signaling to stimulatory signal and thereby enhance T cell function. In some instances, cells are engineered to express the BTLA: ICOS switch receptor in combination with CAR.

Another preferred chimeric protein of the present invention is PD1:CD28. Genetic chimerization of PD1 with CD28 sequences and recombinant expression results in chimeric PD1:CD28 "switch receptor" that demonstrate structural and functional characteristics attributable to both PD1 and CD28. Cells engineered to express PD1:CD28 can redirect inhibitory signaling to stimulatory signal and thereby enhance T cell function. In some instances, cells are engineered to express the PD1:CD28 switch receptor in combination with CAR.

Another preferred chimeric protein of the present invention is CTLA4:CD28. Genetic chimerization of CTLA4 with CD28 sequences and recombinant expression results in chimeric CTLA4:CD28 "switch receptor" that demonstrate structural and functional characteristics attributable to both CTLA4 and CD28. Cells engineered to express CTLA4:CD28 can redirect inhibitory signaling to

stimulatory signal and thereby enhance T cell function. In some instances, cells are engineered to express the CTLA4:CD28 switch receptor in combination with CAR.

The present proteins can exist in numerous forms. For example, the present proteins can be in the form of a linear or branched polypeptide. Linear
5 chimeric proteins can be produced by recombinant DNA technology. For example, chimeric transcription cassettes can be assembled using restriction endonuclease site overlap or the polymerase chain reaction (PCR)-based splice-by-overlap-extension.

Branched polypeptide chimeric proteins can be readily produced by template-assembled synthetic peptide (TASP) technology (Mutter, Trends Biochem.
10 Sci. 13:260-265 (1988)). By this process, the peptide units are synthesized separately and covalently coupled to a multifunctional carrier, such as a core peptide, using chemical coupling reagents. For example, a cyclic decapeptide analogue of gramicidin S, in which two antiparallel beta-sheet segments (lys-ala-lys) are linked by two beta-turns, can be used as a core peptide. Segment condensation strategies can be
15 used to attach the first and second proteins to the epsilon-amino groups of the 4 lysine side chains.

The present proteins can also exist as two or more separate proteins linked together by a bridge, such as a chemical link. For example, two or more protein components can be covalently linked directly to each other in branched
20 structures using chemical cross-linking reagents such as dithio-bis(succinimidyl propionate) (DSP). By this methodology, for example, the first and second proteins can be directly linked.

The particular first and second polypeptides of the chimeric switch receptor of the invention can vary depending on the illness being treated. Typically,
25 for example, when treating cancer or viral infections, second polypeptides that stimulate immune cell responses are used. When treating immune system disorders where pathogenic immune responses exist, an inhibitory second polypeptide is used. Thus, for cancer and viral diseases, switch receptors that convert inhibitory to activating immune activation signals are desired. In contrast, for autoimmune
30 diseases, chimeric switch receptors that convert activating to inhibitory immune signals are desired. In this setting, the immune-inhibitory second protein component can be directed to different pathogenic immune effectors, including T cells, B cells, natural killer cells, and antigen-presenting cells.

Accordingly, the invention provides a switch receptor which when expressed in a cell converts a positive signal into a negative signal in the cell. For example, this switch receptor contains a first domain that comprises a polypeptide that delivers a positive signal; and a second domain that comprises a polypeptide that
5 delivers a negative signal in the cell.

Genetic Modification

The present invention encompasses a cell (e.g., T cell) transduced with a lentiviral vector (LV). In one embodiment, the LV encodes the switch receptor of
10 the invention comprising a first domain that comprises a polypeptide that delivers a negative signal and a second domain that comprises a polypeptide that delivers a positive signal.

In one embodiment, the cell can be further be transduced with a LV encoding a chimeric antigen receptor (CAR) which combines an antigen recognition
15 domain of a specific antibody with an intracellular domain of the CD3-zeta chain or FcγRI protein into a single chimeric protein.

Vectors derived from retroviruses such as the lentivirus are suitable tools to achieve long-term gene transfer since they allow long-term, stable integration of a transgene and its propagation in daughter cells. Lentiviral vectors have the added
20 advantage over vectors derived from onco-retroviruses such as murine leukemia viruses in that they can transduce non-proliferating cells, such as hepatocytes. They also have the added advantage of low immunogenicity.

In brief summary, the expression of natural or synthetic nucleic acids of the invention is typically achieved by operably linking a nucleic acid encoding the
25 desired polypeptide or portions thereof to a promoter, and incorporating the construct into an expression vector. The vectors can be suitable for replication and integration in eukaryotes. Typical cloning vectors contain transcription and translation terminators, initiation sequences, and promoters useful for regulation of the expression of the desired nucleic acid sequence.

30 The nucleic acid can be cloned into a number of types of vectors. For example, the nucleic acid can be cloned into a vector including, but not limited to a plasmid, a phagemid, a phage derivative, an animal virus, and a cosmid. Vectors of particular interest include expression vectors, replication vectors, probe generation vectors, and sequencing vectors.

Further, the expression vector may be provided to a cell in the form of a viral vector. Viral vector technology is well known in the art and is described, for example, in Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1 -3 (3rd ed., Cold Spring Harbor Press, NY 2001), and in other virology and molecular biology manuals. Viruses, which are useful as vectors include, but are not limited to, retroviruses, adenoviruses, adeno- associated viruses, herpes viruses, and lentiviruses. In general, a suitable vector contains an origin of replication functional in at least one organism, a promoter sequence, convenient restriction endonuclease sites, and one or more selectable markers, (e.g., WO 01/96584; WO 01/29058; and U.S. Pat. No. 6,326,193).

Additional promoter elements, e.g., enhancers, regulate the frequency of transcriptional initiation. Typically, these are located in the region 30-110 bp upstream of the start site, although a number of promoters have recently been shown to contain functional elements downstream of the start site as well. The spacing between promoter elements frequently is flexible, so that promoter function is preserved when elements are inverted or moved relative to one another. In the thymidine kinase (tk) promoter, the spacing between promoter elements can be increased to 50 bp apart before activity begins to decline. Depending on the promoter, it appears that individual elements can function either cooperatively or independently to activate transcription.

An example of a promoter is the immediate early cytomegalovirus (CMV) promoter sequence. This promoter sequence is a strong constitutive promoter sequence capable of driving high levels of expression of any polynucleotide sequence operatively linked thereto. However, other constitutive promoter sequences may also be used, including, but not limited to the simian virus 40 (SV40) early promoter, mouse mammary tumor virus (MMTV), human immunodeficiency virus (HIV) long terminal repeat (LTR) promoter, MoMuLV promoter, an avian leukemia virus promoter, an Epstein-Barr virus immediate early promoter, a Rous sarcoma virus promoter, as well as human gene promoters such as, but not limited to, the actin promoter, the myosin promoter, the hemoglobin promoter, and the creatine kinase promoter. Further, the invention should not be limited to the use of constitutive promoters. Inducible promoters are also contemplated as part of the invention. The use of an inducible promoter provides a molecular switch capable of turning on expression of the polynucleotide sequence which it is operatively linked when such

expression is desired, or turning off the expression when expression is not desired. Examples of inducible promoters include, but are not limited to a metallothionine promoter, a glucocorticoid promoter, a progesterone promoter, and a tetracycline promoter.

5 In order to assess the expression of a CAR polypeptide or portions thereof, the expression vector to be introduced into a cell can also contain either a selectable marker gene or a reporter gene or both to facilitate identification and selection of expressing cells from the population of cells sought to be transfected or infected through viral vectors. In other aspects, the selectable marker may be carried
10 on a separate piece of DNA and used in a co-transfection procedure. Both selectable markers and reporter genes may be flanked with appropriate regulatory sequences to enable expression in the host cells. Useful selectable markers include, for example, antibiotic-resistance genes, such as neo and the like.

Reporter genes are used for identifying potentially transfected cells and
15 for evaluating the functionality of regulatory sequences. In general, a reporter gene is a gene that is not present in or expressed by the recipient organism or tissue and that encodes a polypeptide whose expression is manifested by some easily detectable property, e.g., enzymatic activity. Expression of the reporter gene is assayed at a suitable time after the DNA has been introduced into the recipient cells. Suitable
20 reporter genes may include genes encoding luciferase, beta-galactosidase, chloramphenicol acetyl transferase, secreted alkaline phosphatase, or the green fluorescent protein gene (e.g., Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Suitable expression systems are well known and may be prepared using known techniques or obtained commercially. In general, the construct with the minimal 5' flanking region
25 showing the highest level of expression of reporter gene is identified as the promoter. Such promoter regions may be linked to a reporter gene and used to evaluate agents for the ability to modulate promoter-driven transcription.

Methods of introducing and expressing genes into a cell are known in the art. In the context of an expression vector, the vector can be readily introduced
30 into a host cell, e.g., mammalian, bacterial, yeast, or insect cell by any method in the art. For example, the expression vector can be transferred into a host cell by physical, chemical, or biological means.

Physical methods for introducing a polynucleotide into a host cell include calcium phosphate precipitation, lipofection, particle bombardment,

microinjection, electroporation, and the like. Methods for producing cells comprising vectors and/or exogenous nucleic acids are well-known in the art. See, for example, Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL volumes 1-3 (3rd ed., Cold Spring Harbor Press, NY 2001).

5 Biological methods for introducing a polynucleotide of interest into a host cell include the use of DNA and RNA vectors. Viral vectors, and especially retroviral vectors, have become the most widely used method for inserting genes into mammalian, e.g., human cells. Other viral vectors can be derived from lentivirus, poxviruses, herpes simplex virus I, adenoviruses and adeno-associated viruses, and
10 the like. See, for example, U.S. Pat. Nos. 5,350,674 and 5,585,362.

 Chemical means for introducing a polynucleotide into a host cell include colloidal dispersion systems, such as macromolecule complexes, nanocapsules, microspheres, beads, and lipid-based systems including oil-in-water emulsions, micelles, mixed micelles, and liposomes. An exemplary colloidal system
15 for use as a delivery vehicle in vitro and in vivo is a liposome (e.g., an artificial membrane vesicle).

 In the case where a non-viral delivery system is utilized, an exemplary delivery vehicle is a liposome. The use of lipid formulations is contemplated for the introduction of the nucleic acids into a host cell (in vitro, ex vivo or in vivo). In
20 another aspect, the nucleic acid may be associated with a lipid. The nucleic acid associated with a lipid may be encapsulated in the aqueous interior of a liposome, interspersed within the lipid bilayer of a liposome, attached to a liposome via a linking molecule that is associated with both the liposome and the oligonucleotide, entrapped in a liposome, complexed with a liposome, dispersed in a solution
25 containing a lipid, mixed with a lipid, combined with a lipid, contained as a suspension in a lipid, contained or complexed with a micelle, or otherwise associated with a lipid. Lipid, lipid/DNA or lipid/expression vector associated compositions are not limited to any particular structure in solution. For example, they may be present in a bilayer structure, as micelles, or with a "collapsed" structure. They may also simply
30 be interspersed in a solution, possibly forming aggregates that are not uniform in size or shape. Lipids are fatty substances which may be naturally occurring or synthetic lipids. For example, lipids include the fatty droplets that naturally occur in the cytoplasm as well as the class of compounds which contain long-chain aliphatic

hydrocarbons and their derivatives, such as fatty acids, alcohols, amines, amino alcohols, and aldehydes.

Lipids suitable for use can be obtained from commercial sources. For example, dimyristyl phosphatidylcholine ("DMPC") can be obtained from Sigma, St. Louis, MO; dicetyl phosphate ("DCP") can be obtained from K & K Laboratories (Plainview, NY); cholesterol ("Choi") can be obtained from Calbiochem-Behring; dimyristyl phosphatidylglycerol ("DMPG") and other lipids may be obtained from Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL.). Stock solutions of lipids in chloroform or chloroform/methanol can be stored at about -20⁰C. Chloroform is used as the only solvent since it is more readily evaporated than methanol. "Liposome" is a generic term encompassing a variety of single and multilamellar lipid vehicles formed by the generation of enclosed lipid bilayers or aggregates. Liposomes can be characterized as having vesicular structures with a phospholipid bilayer membrane and an inner aqueous medium. Multilamellar liposomes have multiple lipid layers separated by aqueous medium. They form spontaneously when phospholipids are suspended in an excess of aqueous solution. The lipid components undergo self-rearrangement before the formation of closed structures and entrap water and dissolved solutes between the lipid bilayers (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10). However, compositions that have different structures in solution than the normal vesicular structure are also encompassed. For example, the lipids may assume a micellar structure or merely exist as nonuniform aggregates of lipid molecules. Also contemplated are lipofectamine-nucleic acid complexes.

Therapeutic Application

The present invention includes a type of cellular therapy where T cells are genetically modified to express a switch receptor and the engineered T cell is infused to a recipient in need thereof. The infused cell is able to kill tumor cells in the recipient. Unlike antibody therapies, engineered T cells of the invention are able to replicate *in vivo* resulting in long-term persistence that can lead to sustained tumor control.

The present invention is also directed to methods for treating a patient for an illness comprising administering to the patient an effective amount of the engineered switch receptors of the present invention. Various illnesses can be treated according to the present methods, including but not limited to cancer, such as ovarian

carcinoma, breast carcinoma, colon carcinoma, glioblastoma multiforme, prostate carcinoma and leukemia; viral infections, such as chronic viral infections with HBV, HCV, HTLV-I, HTLV-II, EBV, HSV-I, HSV-II, and KSHV; and autoimmune diseases, such as arthritis, asthma, graft-versus-host disease, organ rejection, psoriasis, systemic lupus erythematosus, atopic allergy, inflammatory bowel disease, multiple sclerosis, allergic dermatitis, Sjogren's syndrome, progressive systemic sclerosis, autoimmune thyroiditis, autoimmune diabetes, autoimmune liver diseases, and bone marrow myelodysplastic syndromes.

Examples of cancer include but are not limited to, carcinoma, lymphoma, blastoma, sarcoma, and leukemia or lymphoid malignancies. More particular examples of such cancers include kidney or renal cancer, breast cancer, colon cancer, rectal cancer, colorectal cancer, lung cancer including small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung and squamous carcinoma of the lung, squamous cell cancer (e.g. epithelial squamous cell cancer), cervical cancer, ovarian cancer, prostate cancer, liver cancer, bladder cancer, cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastric or stomach cancer including gastrointestinal cancer, gastrointestinal stromal tumors (GIST), pancreatic cancer, head and neck cancer, glioblastoma, retinoblastoma, astrocytoma, thecomas, arrhenoblastomas, hepatoma, hematologic malignancies including non-Hodgkins lymphoma (NHL), multiple myeloma and acute hematologic malignancies, endometrial or uterine carcinoma, endometriosis, fibrosarcomas, choriocarcinoma, salivary gland carcinoma, vulvar cancer, thyroid cancer, esophageal carcinomas, hepatic carcinoma, anal carcinoma, penile carcinoma, nasopharyngeal carcinoma, laryngeal carcinomas, Kaposi's sarcoma, melanoma, skin carcinomas, Schwannoma, oligodendroglioma, neuroblastomas, rhabdomyosarcoma, osteogenic sarcoma, leiomyosarcomas, urinary tract carcinomas, thyroid carcinomas, Wilm's tumor, as well as B-cell lymphoma (including low grade/follicular non-Hodgkin's lymphoma (NHL); small lymphocytic (SL) NHL; intermediate grade/follicular NHL; intermediate grade diffuse NHL; high grade immunoblastic NHL; high grade lymphoblastic NHL; high grade small non-cleaved cell NHL; bulky disease NHL; mantle cell lymphoma; AIDS-related lymphoma; and Waldenstrom's Macroglobulinemia); chronic lymphocytic leukemia (CLL); acute lymphoblastic leukemia (ALL); Hairy cell leukemia, chronic myeloblastic leukemia; and post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD), as well as abnormal vascular

proliferation associated with phakomatoses, edema (such as that associated with brain tumors), and Meigs' syndrome. "Tumor", as used herein, refers to all neoplastic cell growth and proliferation, whether malignant or benign, and all pre-cancerous and cancerous cells and tissues.

5 In the context of the present invention, "tumor antigen" or "hyperproliferative disorder antigen" or "antigen associated with a hyperproliferative disorder" refer to antigens that are common to specific hyperproliferative disorders. In certain aspects, the hyperproliferative disorder antigens of the present invention are derived from, cancers including but not limited to primary or metastatic melanoma, 10 thymoma, lymphoma, sarcoma, lung cancer, liver cancer, non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkins lymphoma, leukemias, uterine cancer, cervical cancer, bladder cancer, kidney cancer and adenocarcinomas such as breast cancer, prostate cancer, ovarian cancer, pancreatic cancer, and the like.

 In one embodiment, the tumor antigen of the present invention 15 comprises one or more antigenic cancer epitopes immunologically recognized by tumor infiltrating lymphocytes (TIL) derived from a cancer tumor of a mammal.

 Malignant tumors express a number of proteins that can serve as target antigens for an immune attack. These molecules include but are not limited to tissue-specific antigens such as MART-1, tyrosinase and GP 100 in melanoma and prostatic 20 acid phosphatase (PAP) and prostate-specific antigen (PSA) in prostate cancer. Other target molecules belong to the group of transformation-related molecules such as the oncogene HER-2/Neu/ErbB-2. Yet another group of target antigens are onco-fetal antigens such as carcinoembryonic antigen (CEA). In B-cell lymphoma the tumor-specific idiotype immunoglobulin constitutes a truly tumor-specific immunoglobulin 25 antigen that is unique to the individual tumor. B-cell differentiation antigens such as CD19, CD20 and CD37 are other candidates for target antigens in B-cell lymphoma. Some of these antigens (CEA, HER-2, CD 19, CD20, idiotype) have been used as targets for passive immunotherapy with monoclonal antibodies with limited success.

 In the context of treatment for cancer, the switch receptors of the 30 present invention can optionally be administered to a patient in combination with other chemotherapeutic agents. Suitable chemotherapeutic agents include, for example, alkylating agents such as thiotepa and cyclophosphamide; alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines

including altretamine, triethylenemelamine, triethylenephosphoramidate, triethylenethiophosphoramidate and trimethylolmelamine; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, chlorthosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfamide, uracil mustard; nitrosureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, ranimustine; antibiotics such as aclacinomysins, actinomycin, authramycin, azaserine, bleomycins, cactinomycin, calicheamicin, carabycin, caminomycin, carzinophilin, chromomycins, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, doxorubicin, epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomycins, mycophenolic acid, nogalamycin, olivomycins, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-metabolites such as methotrexate and 5-fluorouracil (5-FU); folic acid analogues such as denopterin, methotrexate, pteropterin, trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine, thiamiprine, thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine, 5-FU; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitostanol, mepitostane, testolactone; anti-adrenals such as aminogluthethimide, mitotane, trilostane; folic acid replenisher such as frolinic acid; aceglatone; aldophosphamide glycoside; aminolevulinic acid; amsacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziquone; elformithine; elliptinium acetate; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidamine; mitoguazone; mitoxantrone; mopidamol; nitracrine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; podophyllinic acid; 2-ethylhydrazide; procarbazine; PSK™; razoxane; sizofiran; spirogermanium; tenuazonic acid; triaziquone; 2, 2', 2''-trichlorotriethylamine; urethan; vindesine; dacarbazine; mannomustine; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside ("Ara-C"); cyclophosphamide; thiotepa; taxanes, e.g. paclitaxel (TAXOL™, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) and docetaxel (TAXOTERE™, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); chlorambucil; gemcitabine; 6-thioguanine; mercaptopurine; methotrexate; platinum analogs such as cisplatin and carboplatin; vinblastine; platinum; etoposide (VP-16); ifosfamide; mitomycin C; mitoxantrone; vincristine; vinorelbine; navelbine; novantrone; teniposide; daunomycin; aminopterin; xeloda; ibandronate; CPT-11; topoisomerase inhibitor RFS 2000; difluoromethylornithine (DMFO); retinoic acid;

esperamicins, capecitabine; and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above.

Also included are anti-hormonal agents that act to regulate or inhibit hormone action on tumors such as anti-estrogens including for example tamoxifen, raloxifene, aromatase inhibiting 4(5)-imidazoles, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene,
5 keoxifene, LY117018, onapristone, and toremifene (Fareston); and anti-androgens such as flutamide, nilutamide, bicalutamide, leuprolide, and goserelin; and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above.

Also included are chemotherapeutic agents that are able to sensitize
10 tumor cells to TRAIL and overcome TRAIL resistance, such as proteasome inhibitors and histone deacetylase (HDAC) inhibitors, cycloheximide, imatinib mesylate and other protein tyrosine kinase inhibitors, 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, arsenic trioxide and X-linked Inhibitors of Apoptosis Protein small molecule antagonists; and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of
15 these.

Additional information on the methods of cancer treatment is provided in U.S. Pat. No. 7,285,522, incorporated by reference in its entirety.

Accordingly, in a preferred embodiment, the switch receptors of the present invention can be used to treat breast cancer. In another preferred embodiment,
20 the switch receptors of the invention can be used to treat colon cancer. In another embodiment, the switch receptors of the invention can be used to treat liver cancer. In another preferred embodiment, the switch receptors of the invention can be used to treat ovarian cancer. In another embodiment, the switch receptors of the invention can be used to treat leukemia. In another embodiment, the switch receptors of the
25 invention can be used to treat melanoma. In further embodiments, the switch receptors of the present invention can be used to treat alloimmune diseases, for example graft rejection, or graft-versus-host or host-versus-graft disease.

Typically, for each disease application, a small "library" of candidate switch receptors can be generated and comparatively evaluated in appropriate and
30 well-established ex vivo and in vivo models to determine relative efficacies and toxicities.

The particular first and second proteins used in the methods will vary depending on the illness being treated. Generally, for cancer, switch receptors that convert inhibitory to activating immune trans activation signals are desired. Without

wishing to be bound by any particular theory, the anti-tumor immunity response elicited by the engineered cell of the invention may be an active or a passive immune response. The response may be part of an adoptive immunotherapy approach.

With respect to ex vivo immunization, at least one of the following occurs in vitro prior to administering the cell into a mammal: i) expansion of the cells, ii) introducing a nucleic acid encoding a switch receptor of the invention to the cells or iii) cryopreservation of the cells.

Ex vivo procedures are well known in the art and are discussed more fully below. Briefly, cells are isolated from a mammal (preferably a human) and genetically modified (i.e., transduced or transfected in vitro) with a vector expressing a switch receptor of the invention. The engineered cell can be administered to a mammalian recipient to provide a therapeutic benefit. The mammalian recipient may be a human and the engineered cell can be autologous with respect to the recipient. Alternatively, the cells can be allogeneic, syngeneic or xenogeneic with respect to the recipient.

The procedure for ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells is described in U.S. Pat. No. 5,199,942, incorporated herein by reference, can be applied to the cells of the present invention. Other suitable methods are known in the art, therefore the present invention is not limited to any particular method of ex vivo expansion of the cells. Briefly, ex vivo culture and expansion of T cells comprises: (1) collecting CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells from a mammal from peripheral blood harvest or bone marrow explants; and (2) expanding such cells ex vivo. In addition to the cellular growth factors described in U.S. Pat. No. 5,199,942, other factors such as flt3-L, IL-1, IL-3 and c-kit ligand, can be used for culturing and expansion of the cells.

In addition to using a cell-based vaccine in terms of ex vivo immunization, the present invention also provides compositions and methods for in vivo immunization to elicit an immune response directed against an antigen in a patient.

Generally, the cells activated and expanded as described herein may be utilized in the treatment and prevention of diseases that arise in individuals who are immunocompromised. In particular, the engineered cells of the invention are used in the treatment of cancer. In certain embodiments, the cells of the invention are used in the treatment of patients at risk for developing cancer. Thus, the present invention

provides methods for the treatment or prevention of cancer comprising administering to a subject in need thereof, a therapeutically effective amount of the engineered T cells of the invention.

The engineered T cells of the present invention may be administered
5 either alone, or as a pharmaceutical composition in combination with diluents and/or with other components such as IL-2 or other cytokines or cell populations. Briefly, pharmaceutical compositions of the present invention may comprise a target cell population as described herein, in combination with one or more pharmaceutically or physiologically acceptable carriers, diluents or excipients. Such compositions may
10 comprise buffers such as neutral buffered saline, phosphate buffered saline and the like; carbohydrates such as glucose, mannose, sucrose or dextrans, mannitol; proteins; polypeptides or amino acids such as glycine; antioxidants; chelating agents such as EDTA or glutathione; adjuvants (*e.g.*, aluminum hydroxide); and preservatives. Compositions of the present invention are preferably formulated for intravenous
15 administration.

Pharmaceutical compositions of the present invention may be administered in a manner appropriate to the disease to be treated (or prevented). The quantity and frequency of administration will be determined by such factors as the condition of the patient, and the type and severity of the patient's disease, although
20 appropriate dosages may be determined by clinical trials.

When "an immunologically effective amount", "an anti-tumor effective amount", "an tumor-inhibiting effective amount", or "therapeutic amount" is indicated, the precise amount of the compositions of the present invention to be administered can be determined by a physician with consideration of individual
25 differences in age, weight, tumor size, extent of infection or metastasis, and condition of the patient (subject). It can generally be stated that a pharmaceutical composition comprising the T cells described herein may be administered at a dosage of 10^4 to 10^9 cells/kg body weight, preferably 10^5 to 10^6 cells/kg body weight, including all integer values within those ranges. T cell compositions may also be administered multiple
30 times at these dosages. The cells can be administered by using infusion techniques that are commonly known in immunotherapy (see, *e.g.*, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988). The optimal dosage and treatment regime for a particular patient can readily be determined by one skilled in the art of medicine by monitoring the patient for signs of disease and adjusting the treatment accordingly.

In certain embodiments, it may be desired to administer activated T cells to a subject and then subsequently redraw blood (or have an apheresis performed), activate T cells therefrom according to the present invention, and reinfuse the patient with these activated and expanded T cells. This process can be carried out multiple times every few weeks. In certain embodiments, T cells can be activated from blood draws of from 10cc to 400cc. In certain embodiments, T cells are activated from blood draws of 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc, or 100cc. Not to be bound by theory, using this multiple blood draw/multiple reinfusion protocol, may select out certain populations of T cells.

The administration of the subject compositions may be carried out in any convenient manner, including by aerosol inhalation, injection, ingestion, transfusion, implantation or transplantation. The compositions described herein may be administered to a patient subcutaneously, intradermally, intratumorally, intranodally, intramedullary, intramuscularly, by intravenous (*i.v.*) injection, or intraperitoneally. In one embodiment, the T cell compositions of the present invention are administered to a patient by intradermal or subcutaneous injection. In another embodiment, the T cell compositions of the present invention are preferably administered by *i.v.* injection. The compositions of T cells may be injected directly into a tumor, lymph node, or site of infection.

In certain embodiments of the present invention, cells activated and expanded using the methods described herein, or other methods known in the art where T cells are expanded to therapeutic levels, are administered to a patient in conjunction with (*e.g.*, before, simultaneously or following) any number of relevant treatment modalities, including but not limited to treatment with agents such as antiviral therapy, cidofovir and interleukin-2, Cytarabine (also known as ARA-C) or natalizumab treatment for MS patients or efalizumab treatment for psoriasis patients or other treatments for PML patients. In further embodiments, the T cells of the invention may be used in combination with chemotherapy, radiation, immunosuppressive agents, such as cyclosporin, azathioprine, methotrexate, mycophenolate, and FK506, antibodies, or other immunoablative agents such as CAMPATH, anti-CD3 antibodies or other antibody therapies, cytoxin, fludarabine, cyclosporin, FK506, rapamycin, mycophenolic acid, steroids, FR901228, cytokines, and irradiation. These drugs inhibit either the calcium dependent phosphatase calcineurin (cyclosporine and FK506) or inhibit the p70S6 kinase that is important for

growth factor induced signaling (rapamycin). (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; Isoniemi (supra)). In a further embodiment, the cell compositions of the present invention are administered to a patient in conjunction with (*e.g.*, before, simultaneously or following) bone marrow transplantation, T cell ablative therapy using either chemotherapy agents such as, fludarabine, external-beam radiation therapy (XRT), cyclophosphamide, or antibodies such as OKT3 or CAMPATH. In another embodiment, the cell compositions of the present invention are administered following B-cell ablative therapy such as agents that react with CD20, *e.g.*, Rituxan. For example, in one embodiment, subjects may undergo standard treatment with high dose chemotherapy followed by peripheral blood stem cell transplantation. In certain embodiments, following the transplant, subjects receive an infusion of the expanded immune cells of the present invention. In an additional embodiment, expanded cells are administered before or following surgery.

The dosage of the above treatments to be administered to a patient will vary with the precise nature of the condition being treated and the recipient of the treatment. The scaling of dosages for human administration can be performed according to art-accepted practices. The dose for CAMPATH, for example, will generally be in the range 1 to about 100 mg for an adult patient, usually administered daily for a period between 1 and 30 days. The preferred daily dose is 1 to 10 mg per day although in some instances larger doses of up to 40 mg per day may be used (described in U.S. Patent No. 6,120,766).

EXPERIMENTAL EXAMPLES

The invention is further described in detail by reference to the following experimental examples. These examples are provided for purposes of illustration only, and are not intended to be limiting unless otherwise specified. Thus, the invention should in no way be construed as being limited to the following examples, but rather, should be construed to encompass any and all variations which become evident as a result of the teaching provided herein.

Without further description, it is believed that one of ordinary skill in the art can, using the preceding description and the following illustrative examples, make and utilize the compounds of the present invention and practice the claimed methods. The following working examples therefore, specifically point out the

preferred embodiments of the present invention, and are not to be construed as limiting in any way the remainder of the disclosure.

Example 1: Switch Receptors

5 The results presented herein demonstrate that chimeric receptors can be engineered to convert negative signals into positive signals on T cells. Experiments were designed to develop a method that avoids inhibition of a tumor inhibitory factor systemically and therefore the entire immune system. Briefly, T cells were engineered to express a chimeric receptor that encoded the PD-1
10 extracellular domain (without the inhibitory PD-1 domain) and a stimulatory CD28 or ICOS signaling domain. The orientation of the chimeric receptor placed the PD-1 extracellular domain outside the cell and the CD28 or ICOS stimulatory domain inside the T cell. Thus the interaction of T cells with tumor antigens in the tumor microenvironment is positively influenced upon the engagement of PD-1 ligands
15 because the signal in the cell is delivered by the CD28 or ICOS signaling endodomain rather than the native inhibitory PD-1 endodomain.

The materials and methods employed in these experiments are now described.

20 Materials and Methods

Switch Receptor Production

Constructs were designed for the testing of BTLA switch receptor. The following are sequence of each construct that were cloned into pGEM.64A based IVT vector.

25

BTLA; SEQ ID NO: 1

Atgaagacattgcctgccatgcttgaactgggaattattttgggtcttcttctaatcccatatctggacatctggaacatcc
atgggaagaatcatgtgatgtacagctttatataaagagacaatctgaacactccatcttagcaggagatcccttgaactag
aatgccctgtgaaatactgtgctaacaggcctcatgtgacttggtgcaagctcaatggaacaacatgtgtaaaactgaagat
30 agacaaacaagttggaaggaagagaagaacattcattttcattctacatttgaaccagtgcttctaatgacaatgggtcat
accgctgttctgcaaatttcagctaatctcattgaaagccactcaacaactcttatgtgacagatgtaaaaagtcctcaga
acgaccctccaaggacgaaatggcaagcagaccctggctctgtatagttacttcttgggggattgcctctactcatca
ctacctgtttctgcctgttctgctgcctgagaaggcaccaaggaaagcaaatgaactcttgacacagcaggaaggaaa
ttaacctggttgatgctcaccttaagagtgaacagaagcaagcaccaggcaaaattccaagtactgctatcagaaa

ctggaatttatgataatgacctgacctttgtttcaggatgcaggaagggtctgaagttattctaataccatgcctggaagaaaa
caaaccaggcattgtttatgcttcctgaaccattctgtcattggaccgaactcaagactggcaagaaatgtaaagaagcac
caacagaatatgcatccatatgtgtgaggagttaa

5 **BTLA-BTM-CD28; SEQ ID NO: 2**

Aagcttgccgcatgaagacattgcctgccatgcttggaaactgggaaattatttgggtcttcttctaataccatatctggac
atctggaacatccatgggaaagaatcatgtgatgtacagctttatataaagagacaatctgaacactccatcttagcaggaga
tccctttgaactagaatgccctgtgaaatactgtgtaaacaggcctcatgtgacttgggtgcaagctcaatggaacaacatgtgt
aaaacttgaagatagacaaacaagttggaaggaagagaagaacatttcattttcattctacattttgaaccagtgttctcta
10 gacaatgggtcataccgctgttctgcaaattttcagtctaattctcattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaa
aaagtgcctcagaacgacctccaaggacgaaatggcaagcagacctgggtcctgtatagttacttctttggggggatt
gccttactcatcactacctgtttctgcctgttctgctgcctggaggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgtactacatg
aacatgactccccgccggccggccacccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatc
gtcctgataagcgggccgca

15

BTLA-BTM-CD27; SEQ ID NO: 3

Aagcttgccgcatgaagacattgcctgccatgcttggaaactgggaaattatttgggtcttcttctaataccatatctggac
atctggaacatccatgggaaagaatcatgtgatgtacagctttatataaagagacaatctgaacactccatcttagcaggaga
tccctttgaactagaatgccctgtgaaatactgtgtaaacaggcctcatgtgacttgggtgcaagctcaatggaacaacatgtgt
20 aaaacttgaagatagacaaacaagttggaaggaagagaagaacatttcattttcattctacattttgaaccagtgttctcta
gacaatgggtcataccgctgttctgcaaattttcagtctaattctcattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaa
aaagtgcctcagaacgacctccaaggacgaaatggcaagcagacctgggtcctgtatagttacttctttggggggatt
gccttactcatcactacctgtttctgcctgttctgctgcctggaaggaaatagatcaacaaggagaaagtctgtgga
gcctgcagagcctgtgtgtacagctgccccaggaggaggaggcagcaccatccccatccaggaggattaccgaaaa
25 ccggagcctgcctgctccccctgataagcgggccgca

25

BTLA-ITM-CD28; SEQ ID NO: 4

aagcttgccgcatgaagacattgcctgccatgcttggaaactgggaaattatttgggtcttcttctaataccatatctggacat
ctggaacatccatgggaaagaatcatgtgatgtacagctttatataaagagacaatctgaacactccatcttagcaggagatc
30 cctttgaactagaatgccctgtgaaatactgtgtaaacaggcctcatgtgacttgggtgcaagctcaatggaacaacatgtgt
aaacttgaagatagacaaacaagttggaaggaagagaagaacatttcattttcattctacattttgaaccagtgttctcta
acaatgggtcataccgctgttctgcaaattttcagtctaattctcattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaaa
agtgcctcagaacgacctccaaggacgaaatggcaagcagacctgggtcctgtatagtttctggttaccataggtgt
gcagcctttgttagtctgcattttgggatgcatacttattgaggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgtactacatga

30

acatgactccccgccgccccggcccccaccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcg
ctcctgataagcgccgca

BTLA-ITM-CD27; SEQ ID NO: 5

5 Aagcttgccgcatgaagacattgcctgccatgcttggaaactgggaaattatttgggtcttctttaaaccatactggaca
tctggaacatccatgggaaagaatcatgtgatgtacagctttatataaagagacaatctgaacactccatcttagcaggagat
ccctttgaactagaatgccctgtgaaatactgtgctaacaggccctcatgtgacttgggtgcaagctcaatggaacaacatgtgt
aaaacttgaagatagacaaacaagttggaaggaagagaagaacatttcattttcattctacattttgaaccagtgttccta
gacaatgggtcataccgctgttctgcaaattttcagctctaattcattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaa
10 aaagtgcctcagaacgacctccaaggacgaaatggcaagcagaccctggctcctgtatagtcttggttacccataggat
gtgcagcctttgtttagtctgcattttgggatgcatactattgaaggaaatatagatcaacaaaggagaaagtctgtgg
agcctgcagagccttgtcttacagctgccccaggaggaggaggaggcagcaccatccccatccaggaggattaccgaaa
accggagcctgcctgctccccctgataagcgccgca

BTLA-BTM-ICOS; SEQ ID NO: 6

Aagcttgccgcatgaagacattgcctgccatgcttggaaactgggaaattatttgggtcttctttaaaccatactggaca
tctggaacatccatgggaaagaatcatgtgatgtacagctttatataaagagacaatctgaacactccatcttagcaggagat
ccctttgaactagaatgccctgtgaaatactgtgctaacaggccctcatgtgacttgggtgcaagctcaatggaacaacatgtgt
aaaacttgaagatagacaaacaagttggaaggaagagaagaacatttcattttcattctacattttgaaccagtgttccta
20 gacaatgggtcataccgctgttctgcaaattttcagctctaattcattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaa
aaagtgcctcagaacgacctccaaggacgaaatggcaagcagaccctggctcctgtatagtcttcttggggggatt
gccttactcatcactacctgtttctgcctgttctgctgcctgtgttggttacaaaaagaagtattcatccagtgtgcacgacc
ctaacgggtaatacatgttcatgagagcagtgaacacagccaaaaaatctagactcacagatgtgacctataagcgccg
ca

25

BTLA-BTM-ICOS-Z; SEQ ID NO: 7

Aagcttgccgcatgaagacattgcctgccatgcttggaaactgggaaattatttgggtcttctttaaaccatactggaca
tctggaacatccatgggaaagaatcatgtgatgtacagctttatataaagagacaatctgaacactccatcttagcaggagat
ccctttgaactagaatgccctgtgaaatactgtgctaacaggccctcatgtgacttgggtgcaagctcaatggaacaacatgtgt
30 aaaacttgaagatagacaaacaagttggaaggaagagaagaacatttcattttcattctacattttgaaccagtgttccta
gacaatgggtcataccgctgttctgcaaattttcagctctaattcattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaa
aaagtgcctcagaacgacctccaaggacgaaatggcaagcagaccctggctcctgtatagtcttcttggggggatt
gccttactcatcactacctgtttctgcctgttctgctgcctgtgttggttacaaaaagaagtattcatccagtgtgcacgacc
ctaacgggtaatacatgttcatgagagcagtgaacacagccaaaaaatctagactcacagatgtgacctatgcagagtga

agttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggecagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaa
gagaggagtacgatgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggaaagccgagaaggaagaaccct
caggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgc
cggagggggcaagggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgc
5 aggcctgccccctcgctaagcgccgca

BTLA-ITM-ICOS; SEQ ID NO: 8

Aagcttgcgccatgaagacattgcctgccatgcttgaactgggaaattatfttgggtcttcttctaatcccatatctggaca
tctggaacatccatgggaaagaatcatgtgatgtacagctttatataaagagacaatctgaacactccatcttagcaggagat
10 cctttgaactagaatgccctgtgaaatactgtgctaacaggcctcatgtgacttggcgcaagctcaatggaacaacatgtgt
aaaacttgaagatagacaacaagtgggaaggagaagaacatttcattttcattctacattttgaaccagtgttccta
gacaatgggtcataccgctgttctgcaaattttcagtctaattctcattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaa
aaagtgcctcagaacgacctccaaggacgaaatggcaagcagacctggctcctgtatagtttctggttacctataggat
gtgcagcctttgtgtagtctgcattttgggatgcatacttattgttggcttacaaaaaagaagtattcatccagtgtgcacgac
15 cctaacgggtgaatacatgttcatgagagcagtgaacacagccaaaaaatctagactcacagatgtgacctataagcgggcc
gca

BTLA-ITM-ICOS-Z; SEQ ID NO: 9

aagcttgcgccatgaagacattgcctgccatgcttgaactgggaaattatfttgggtcttcttctaatcccatatctggacat
20 ctggaacatccatgggaaagaatcatgtgatgtacagctttatataaagagacaatctgaacactccatcttagcaggagafc
cctttgaactagaatgccctgtgaaatactgtgctaacaggcctcatgtgacttggcgcaagctcaatggaacaacatgtgta
aaacttgaagatagacaacaagtgggaaggagaagaacatttcattttcattctacattttgaaccagtgttccta
acaatgggtcataccgctgttctgcaaattttcagtctaattctcattgaaagccactcaacaactctttatgtgacagatgtaaaa
agtgccctcagaacgacctccaaggacgaaatggcaagcagacctggctcctgtatagtttacttctttggggggattgc
25 ctctactcatcactacctgtttctgcctgttctgctgcctgtgttggcttacaaaaaagaagtattcatccagtgtgcacgacct
aacgggtgaatacatgttcatgagagcagtgaacacagccaaaaaatctagactcacagatgtgacctatgcagagtgaag
ttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcaggggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaaga
gaggagtacgatgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggaaagccgagaaggagaaccctca
ggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccg
30 gagggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcag
gccctgccccctcgctaagcgccgca

Transduction of T cells
Methods of T cell preparation using paramagnetic polystyrene beads -

coated with anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies have been described (Laport et al., 2003, Blood 102:20042013). Lentiviral transduction was performed as described (Levine et al., 2006, Proc Natl Acad Sci U S A 103:17372-17377). Electroporation of T cells with RNA has been described (2010, Zhao et al., Cancer Res 70:9062) as a method to express these receptors. The use of adenoviral vectors has been described (2004, Schroers et al., Exp Hematol 32:536). A number of other approaches to express proteins in T cells have been described (2009, June et al., Nat Rev Immunol 9:704).

10 *Cytokine analyses*

Quantification of soluble cytokine factors was performed using Luminex bead array technology and kits purchased from Life technologies (Invitrogen). Assays were performed as per the manufacturer protocol with an 8 point standard curve generated using a 3-fold dilution series.

15 The results of the experiments are now described.

The results presented herein demonstrate that a chimeric receptor can be engineered and expressed on a T cell where the chimeric receptor converts negative signals into positive signals on the T cell. Accordingly, the invention provides a type of adoptive T cell or NK cell therapy using cells that have been
20 genetically modified to express T cell receptors (TCRs) or chimeric antigen receptors (CARs).

Experiments were designed to develop a targeted method to avoid the inhibition of PD-1 systemically and therefore the entire immune system. The targeted method comprises administering T cells that express chimeric receptors that encode
25 for example the PD-1 extracellular domain, and rather than the inhibitory PD-1 domain, a stimulatory CD28 or ICOS signaling domain on the intracellular part of the T cell. Thus the interaction of T cells with tumor antigens in the tumor microenvironment would be positively influenced upon the engagement of PD-1 ligands, because the signal in the cell is delivered by the CD28 or ICOS signaling
30 endodomain, rather than the native PD-1 endodomain.

Converting BTLA signals

In a similar approach, chimeric receptors encoding BTLA have been constructed. BTLA, along with PD-1 is also a member of the CD28 family. BTLA has several ligands, including HVEM, which is expressed on tumor cells and other cells, often within the tumor microenvironment. It is well known that BTLA interaction with natural ligands on cells negatively regulates the T-cell immune responses (Paulos et al., 2010, J Clin Invest 120:76-80; Derré et al., 2010, J Clin Invest 120:157-67; Chemnitz et al., 2006, J Immunol 176:6603-14). To circumvent chimeric receptors comprised of the BTLA extracellular domain and intercellular signaling endodomains that include CD28 or ICOS domains were constructed.

Briefly, molecular cloning was used to construct the exemplary chimeric receptors depicted in Figure 1. To test whether ligation of BTLA CCR expressed on the T cells surface could be expressed properly and transduce signals through ICOS intracellular domain to CD3 zeta, IVT mRNAs encoding BTLA CCR as indicated were electroporated into stimulated T cells and surface expression of BTLA was detected by HVEM-Fc fusion protein at different time as indicated (Figure 1B). Electroporated T cells were either stimulated with BTLA ligand negative cell line (KTPolCD86A2) or BTLA ligand HVEM positive cell line (KTCD86Flu HVEM). Twenty-four hours post stimulation, IL-2 produced by the T cells was assayed by ELISA (Figure 1C). The results showed that by fusing BTLA extracellular domain with intracellular domains of both ICOS and CD3 zeta, T cells could be activated by stimulation of BTLA ligand HVEM expressing cell line, indication BTLA signal could converted to other signals in the form of chimeric co-stimulatory receptor (CCR).

The next set of experiments was designed to assess whether the BTLA inhibitory signal could be converted to a CD28 costimulatory signal through BTLA-CD28 CCR. To find the proper window that could show CD28 signaling, different doses of RNA (ug/0.1ml T cells) were electroporated into T cells and CAR (CD19z, CD19-28Z) expression was detected by FACS. Upper panel shows histograms and the percentage of transgene expression and the lower panel shows the MFI of transgene expression (Figure 2A). IL2 production of RNA electroporated T cells as described in Figure 2A were stimulated by CD19 positive cell line K562-CD19 and IL-2 production was assay by ELISA as shown in Figure 2B. Upper panel shows IFN-gamma and lower panel shows IL-2 production. The results shows that at RNA dose of 1.5 ug, unlike CD19-28z RNA electroporated T cells, which showed over

300pg/ml IL-2 production, there was no detectable IL-2 production for CD19z RNA electroporated T cells. IFN-gamma production could be detected at similar levels for both CD19z and CD19-28Z electroporated T cells with the RNA dose of 1.5 ug. Therefore, 1.5 ug RNA was used as RNA dose to test the BTLA-CD28 signal converting polypeptide.

T cells were co-electroporated with 1.5ug CD19z and BTLA CCR as indicated and stimulated with K562 expressing CD19 (K562CD19) or both CD19 and HVEM (K562CD19/HVEM). K562 lines expressing mesothelin (with or without HVEM) were used as controls (Figure 2C). The results show that full length (wild type) BTLA suppressed both IL2 and IFN-gamma production. There was no detectable IL-2 production for T cells electroporated with only CD19z when stimulated with CD19/HVEM double positive cell line, while T cells electroporated with CD19-28z and stimulated with CD19/HVEM double positive cell line produced over 400pg/ml IL-2. However, when T cells were co-electroporated with both CD19z and BTLA-CD28 CCR RNAs, the IL-2 production was 4 time higher than CD19-28z electroporated T cells, when stimulated with CD19/HVEM double positive cell line. T cells co-electroporated with both CD19z and BTLA-CD28 CCR RNAs produced higher IFN-gamma than CD19z or CD19-28z electroporated T cells, when stimulated with CD19/HVEM double positive cell line, or CD19 positive K562 that expresses low levels of HVEM (Figure 2C). The results presented herein demonstrate that BTLA inhibitory signals could be converted to CD28 signals through BTLA-CD28 CCR.

The next set of experiments was designed to test if the inhibitory BTLA signal could be converted to a costimulatory ICOS signal through BTLA-ICOS CCR. Briefly, converting BTLA to ICOS signal was tested in a Th17 polarization system as shown in Figure 3A. Resting CD4 T cells were co-electroporated with CD19z and BTLA CCRs as indicated (Treatment) and stimulated with CD19/HVEM double positive cell line (Group 1 and 2, duplicates), or T cells were electroporated with BTLA-ICOS alone and stimulated with plate bound HVEM-Fc and OKT3 (group 3). CD3/ICOS beads or CD3/CD28 beads were used as positive and negative controls respectively as described (2010, Paulos et al., Science Translational Medicine). All cultures were conducted in the presence of a Th17 cytokine cocktail. On different days (as indicated) post stimulation, the T cells were stimulated with PMA/Ionomycin and IL-17A and IFN-gamma was detected by intracellular cytokine

staining (Figure 3B). The results showed that ICOS signal converted from BTLA-ICOS enhanced Th17 cell production in the presence of HVEM inhibitory signals.

Converting PD-1 to CD28 signals

5 To test whether ligation of PD1 CCR expressed on the T cells surface could be expressed functionally to transduce signals through CD28 or CD27 or ICOS intracellular domain, IVT RNAs encoding PD1 CCR were used (sequences shown below).

10 PD1-I-ICOS; SEQ ID NO. 10

Atgcagatcccacaggcgccctggccagtcgtctggggcgggtgctacaactgggctggcgccaggatggttcttagact
ccccagacaggcccttggaacccccccaccttctccccagccctgctcgtggtgaccgaaggggacaacgccaccttcac
ctgcagcttctccaacacatcgagagcttctgctaaactggtaccgatgagccccagcaaccagacggacaagctgg
ccgacctccccgaggaccgcagccagccggccaggactgccgcttccgtgtcacacaactgcccaacgggcgtgactt
15 ccacatgagcgtggtcagggccggcgcaatgacagcggcacctacctctgtggggccatctccctggcccccaggc
gcagatcaaagagagcctgcgggcagagctcagggtgacagagagaagggcagaagtgccacagcccacccagc
ccctcaccagggccagccggccagttccaacctggtgttctggttaccataggatgtgcagcctttgtttagtctgcatt
ttgggatgcatacttatttgttggcttacaaaaaagaagtattcatccagtgtcacgaccctaacggtgaatacatgttcatga
gagcagtgaaacacagccaaaaaatctagactcacagatgtgacctataa

20

PD1-28-CD28; SEQ ID NO. 11

Atgcagatcccacaggcgccctggccagtcgtctgggcggtgctacaactgggctggccggccaggatggttcttagact
ccccagacaggccctggaacccccccaccttctccccagccctgctcgtggtgaccgaaggggacaacgccaccttca
ctgcagcttctccaacacatcgagagcttcgtgctaaactggtaccgcatgagccccagcaaccagacggacaagctgg
25 ccgccttccccgaggaccgcagccagccggccaggactgccgcttccgtgtcacacaactgcccaacgggcgtgactt
ccacatgagcgtggtcaggggccggcgcaatgacagcggcacctacctctgtggggccatctccctggcccccaaggc
gcagatcaaagagagcctgcgggcagagctcagggtgacagagagaagggcagaagtgccacagcccaccccagc
ccctacccaggccagccggccagttccaacccctgggtgttttgggtgctggtggtggtggtgagtcctggcttgctata
gcttgctagtaacagtggcctttattattttctgggtgaggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatg
30 actccccgccgccccgggcccaccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgtctcta
a

PD1-CD27; SEQ ID NO. 12

Atgcagatcccacaggcgccctggccagtcgtctgggcggtgctacaactgggctggcgccaggatggttcttagact
 cccagacaggccctggaacccccccaccttctccccagccctgctcgtggtagccgaaggggacaacgccaccttcac
 ctgcagcttctcaacacatcgagagcttcgtgctaaactggtaccgcatgagccccagcaaccagacggacaagctgg
 ccgccttccccgaggaccgcagccagccggccaggactgccgcttccgtgtcacacaactcccaacgggctgactt
 5 ccacatgagcgtggtagggcccgcgcaatgacagcggcacctacctctgtggggccatctccctggccccaaggc
 gcagatcaaagagagcctgcgggcagagctcagggtgacagagagaagggcagaagtggccacagcccccagc
 ccctcaccagggccagccggccagtccaaccctggtgatccttgtgatcttcttgaatgttcctgttttcacctggcc
 ggggccctgttctccatcaacgaaggaaatatagatcaaacaaggagaaagtctgtggagcctgcagagcctgtcgt
 tacagctgccccaggaggaggaggggcagcaccatcccatccaggaggattaccgaaaaccggagcctgcctgtcc
 10 ccctaa

PD1 CCR as indicated and CD19z RNA were co-electroporated into
 stimulated T cells and the transgenes were detected by anti-PD1 and anti-CAR Abs at
 the time points as indicated (Figure 4A). Co-electroporated T cells as described in
 15 Figure 4A were co-cultured with Nalm6 (human B cell leukemia line) expressing PD-
 L1 or GFP as control, or K562-CD19 expressing PD-L1, or ICOSL as control. IFN-
 gamma production was assayed 24h after co-culture. T cells co-introduced with
 CD19z and PD1-CD28 (PD1-28) showed significantly higher IFN-gamma production
 than T cells electroporated with CD19z alone, or co-electroporated with PD1 with
 20 cytoplasmic domain being truncated, or PD1-CD27 (PD1-27). When co-cultured with
 CD19/PD-L1 double positive cell lines. Strong T cell inhibition was seen when T
 cells were co-electroporated with CD19z and full length (wild type) PD1 and
 stimulated with CD19/PD-L1 double positive cell lines (Figure 4B).

Co-electroporated T cells as described in Figure 4A were co-cultured
 25 with Nalm6 (human B cell leukemia line) expressing PD-L1 or GFP as control, or
 K562-CD19 expressing PD-L1, or ICOSL as control. IL-2 production was assayed
 24h after co-culture. T cells co-introduced with CD19z and PD1-CD28 (PD1-28)
 showed significantly higher IL-2 production than T cells electroporated with CD19z
 alone, or co-electroporated with PD1 with cytoplasmic domain being truncated, or
 30 PD1-CD27 (PD1-27). When co-cultured with CD19/PD-L1 double positive cell lines,
 strong T cell inhibition was seen when T cells co-electroporated with CD19z and full
 length PD1 and stimulated with CD19/PD-L1 double positive cell lines (Figure 4C).

Co-electroporated T cells as described in Figure 4A were tested in a
 flow based CTL assay. T cells co-introduced with CD19z and PD1 showed

significantly reduced killing ability against Nalm6-PD-L1 targets, while no significant differences were seen for T cells co-electroporated with PD1 CCRs compared to T cells electroporated with CD19Z alone, when using Nalm6-PD1 as target. When PD1 ligand negative Nalm6 was used as target, no significant differences were found for all T cell groups, including T cells co-electroporated with CD19z and PD1.

The next set of experiments was designed to reverse PD1 inhibition by PD1-CD28 CCR co-introduction. To mimic that of the tumor microenvironment or under chronic infection where the T cells are PD1 positive, T cells were stimulated with CD3/CD28 beads or OKT3/PBMC/IL2 and were co-electroporated with CD19z (10ug) and PD1 (5ug) with additional PD1 CCR (10ug) as indicated. CAR and PD1 and/or PD1 CCR expression were detected by FACS one day post electroporation (Figure 5A).

T cells electroporated as shown in Figure 5A were co-cultured with Nalm6 or K562-CD19 expressing PD-L1. IL-2 production was assayed after overnight co-culture. The results showed that there was a decreased amount of IL-2 produced by T cells electroporated with CD19z alone, compared with the same T cells co-cultured with CD19 positive cell lines without PD-L1. However, in the presence of PD1, the IL-2 production was completely blocked when co-cultured with PD-L1 positive cell lines, except the T cells co-electroporated with PD1-CD28 (PD1-28), which showed much higher IL-2 production than CD19Z alone T cells, while PD1 expression on the T cells had minimum influence on T cells when the T cells were co-cultured with PD-L1 negative cell lines (Figure 5B).

T cells electroporated as shown in Figure 5A were co-cultured with Nalm6 or K562-CD19 expressing PD-L1. IFN-gamma production was assayed after overnight co-culture (Figure 5C). A similar cytokine production profile was seen as that of IL-2 production shown in figure 5B. The results presented herein demonstrate that PD1-CD28 CCR can reverse the inhibitory effect of PD1 and promote T cell effector functions.

30 Converting PD1 to ICOS signals

CD4 T cells were electroporated with PD1 (or PD1 variants) and CD19-z CAR mRNA (10 ug each). 4 hours after electroporation (day0), T cells were mixed with K562 cells (0.5 : 1 = K562 : T cell) expressing PD-L1 and CD19 in R10-culture media in the presence of IL1 (10ng/ml), IL6 (10ng/ml), IL23 (20ng/ml), and

neutralizing antibodies (10µg/ml) against IL4 and IFN γ . At indicated days (5, 9, and 12 days after electroporation) cells were incubated for 4 hours with PMA (3 ug/ml) and ionomycin (1 ug/ml) and GolgiStop for intracellular cytokine staining. Surface staining for CD4 was performed, followed by intracellular staining for IFN-gamma, IL17 and IL2. CD4 T cells stimulated with anti-CD28/CD3 beads and anti-ICOS/CD3 beads were used as controls (Figure 6A). Cytokine production was enhanced, particularly at day 9 in cells expressing PD1-ICOS compared to PD1 wild type or tailess PD1. Cellular proliferation of stimulated T cells is shown in Figure 6C.

10 PD-1 chimeric receptors

PD-1 is upregulated on the surface of exhausted CD8 T cells in patients with chronic viral infection. Blocking the PD-1:PD-L1 signal restores the function of PD-1 expressing exhausted CD8 T cells. Many tumors express PD-L1 providing a immunosuppressive microenvironment.

15 The purpose of the following experiments is to direct adoptively transferred T cells to overcome the inhibitory tumor microenvironment by introducing PD-1 chimeric receptors to the tumor site.

It was observed that the inhibitory effect of PD1wt on cytokine production is rescued by PD1 chimeric constructs (Figure 7). However, PD1 chimeric 20 receptors do not affect granzyme B production (Figure 8). Similarly, minimal differences were observed in the killing activity of CD8 T cells in the presence or absence of PD1 (Figure 9).

The next set of experiments was designed to evaluate the effect of PD-1 chimeric receptors on T cell proliferation (Figure 10). It was observed that PD1- 25 CD28 chimeric receptor increases the number of CD8 T cells (Figure 11).

In summary, the results presented herein demonstrate that PD-1 chimeric constructs do not exhibit the inhibitory effects shown by PD-1 wt. PD1-CD28 seems to augment the production of TNF α , IL2 and IFN γ in CD4 T cells. PD-1 chimeric receptors did not show increased cytotoxicity above that of T cells 30 expressing CD19CARz itself. PD1-CD28 increased CD8 T cell numbers above that of T cells expressing CD19CARz itself.

Redirecting Co-inhibitory Signaling to Positive Co-stimulation

The results presented herein demonstrate that switch receptors were expressed in T cells by electroporation, or with lentiviral vectors. It was observed that CARs and switch receptors can be expressed in the same T cell. When the cells expressing CARs or TCRs and switch receptor are exposed to tumor cells that have
5 ligands for BTLA or PD-1, the T cells are shown to have a positive immune response, rather than the usual inhibitory response.

When these chimeric receptors are expressed in T cells, in the case of the BTLA switch receptor, upon interaction with their natural ligand HVEM on the tumor cells, it was observed that the T cells were stimulated and then expressed
10 functions associated with positive antitumor effects, including the secretion of IFN-gamma.

Another important result from these studies is that the HVEM:BTLA interaction with the chimeric receptor led to enhanced IL-17 secretion. This is a marker of TH17 cells, a cell that is known to be useful for tumor immunotherapy
15 (Martin-Orozco et al., 2009, Immunity 31:787-98; Paulos et al., 2010, Science Translational Medicine 2:55-78; Garaude et al., 2010, Sci Transl Med 2(55):55ps2). For example, the results presented herein demonstrate that the T cells expressing CARs and BTLA switch receptors with ICOS signaling domains were polarized to secrete large amounts of IL-17.

20 In addition, the results presented herein show that the T cells expressing CARs and PD1 switch receptors with CD28, and deleted domains were prevented from having inhibition and instead killed tumor cells and secrete cytokines (IL-2 and IFN-gamma) if they expressed PD-1 switch receptors.

Without wishing to be bound by any particular theory, it is believed
25 that by expressing chimeric antigen receptors (CARs) with PD-1 or BTLA switch receptors on T cells that are then introduced into the tumor microenvironment, the T cells have an enhanced antitumor effect and display the TH17 phenotype. The type of adoptive T cell transfer for tumor immunotherapy of the invention is also applicable in the area of vaccine therapy, such as for chronic viral infections including HIV or
30 other viruses such as EBV, HCV or CMV. This technology could be easily incorporated into other trials that are currently using genetically modified T cells with TCRs as well. For example, the switch receptors of the invention can be used in the context of T cells with TCRs specific for cancer antigens such MAGE-A3 and NY-

ESO-1, and it is believed that the inclusion of the switch receptors with these T cells would increase the potency of the T cells.

The disclosures of each and every patent, patent application, and
5 publication cited herein are hereby incorporated herein by reference in their entirety. While this invention has been disclosed with reference to specific embodiments, it is apparent that other embodiments and variations of this invention may be devised by others skilled in the art without departing from the true spirit and scope of the invention. The appended claims are intended to be construed to include all such
10 embodiments and equivalent variations.

CLAIMS

What is claimed is:

1. A fusion protein comprising a first domain and a second domain, wherein said first domain is a polypeptide that is associated with a negative signal and said second domain is a polypeptide that is associated with a positive signal.
2. The fusion protein of claim 1, wherein said first domain is at least a portion of the extracellular domain of the polypeptide that is associated with a negative signal and said second domain is at least a portion of the intracellular domain of the polypeptide that is associated with a positive signal.
3. The fusion protein of claim 1, further comprising a transmembrane domain.
4. The fusion protein of claim 3, wherein said transmembrane domain is the transmembrane domain of the polypeptide that is associated with a negative signal or the transmembrane domain of the polypeptide that is associated with a positive signal.
5. The fusion protein of claim 1, wherein said polypeptide that is associated with a negative signal is selected from the group consisting of CTLA4, PD-1 and BTLA.
6. The fusion protein of claim 1, wherein said polypeptide that is associated with a positive signal is selected from the group consisting of CD28 and ICOS.
7. A cell engineered to express a fusion protein comprising a first domain and a second domain, wherein the said domain is a polypeptide that is associated with a negative signal and said second domain is a polypeptide that is associated with a positive signal.

8. The cell of claim 7 further comprising a chimeric antigen receptor (CAR), wherein said CAR comprises an antigen recognition domain of a specific antibody and an intracellular domain of the CD3-zeta chain.

9. A vector comprising a first domain and a second domain, wherein said first domain is a polypeptide that is associated with a negative signal and said second domain is a polypeptide that is associated with a positive signal.

10. A method of treating a cancer patient, said method comprising administering to said patient a T cell genetically engineered to express a fusion protein comprising a first domain and a second domain, wherein said first domain is a polypeptide that is associated with a negative signal and said second domain is a polypeptide that is associated with a positive signal.

11. The method of claim 10, wherein said T cell is further genetically engineered to express a chimeric antigen receptor (CAR), wherein said CAR comprises an antigen recognition domain of a specific antibody and an intracellular domain of the CD3-zeta chain.

12. The method of claim 11, wherein said T cell is an autologous T cell.

Fig. 1. Chimeric Receptors

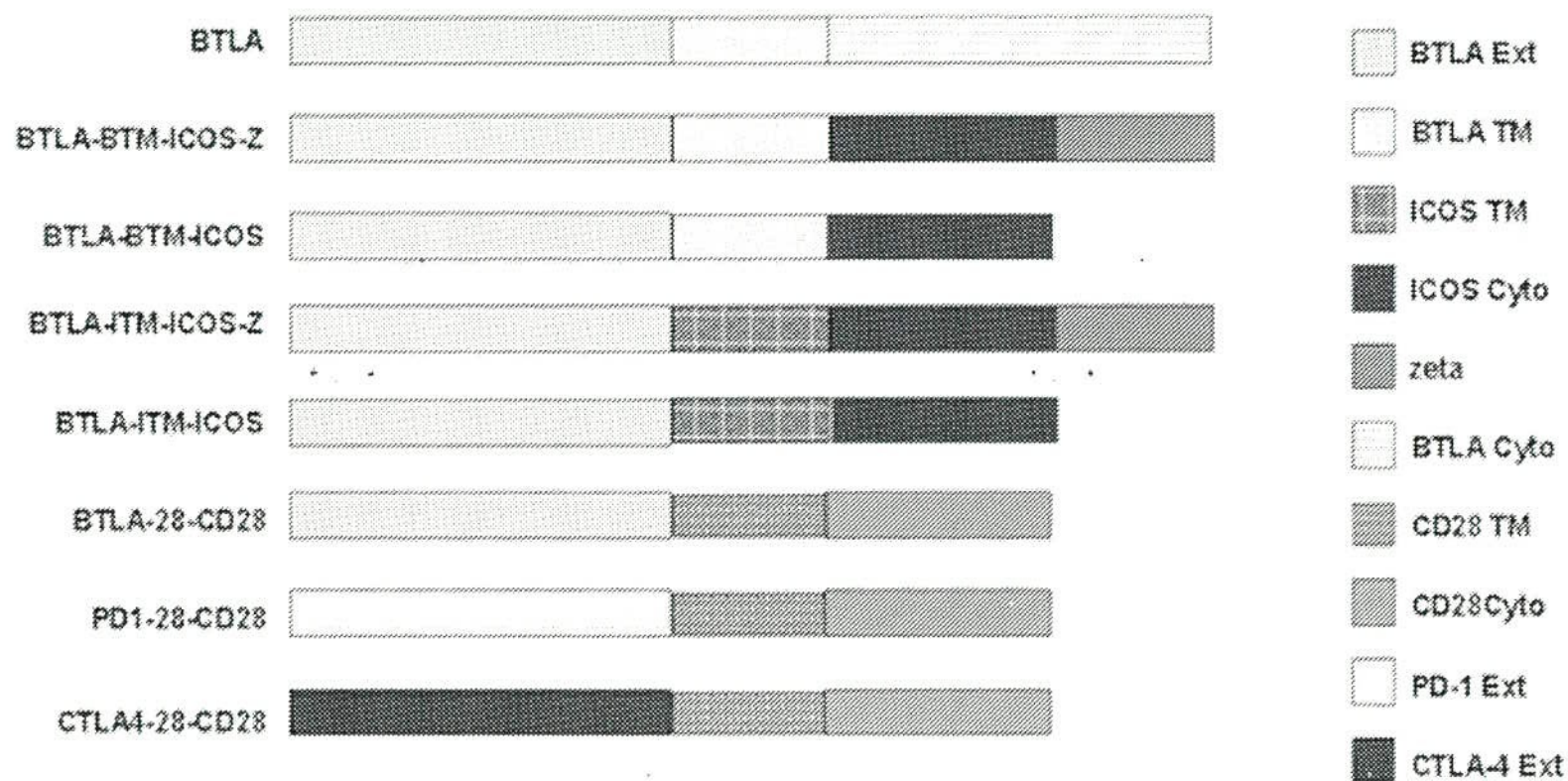


Figure 1A

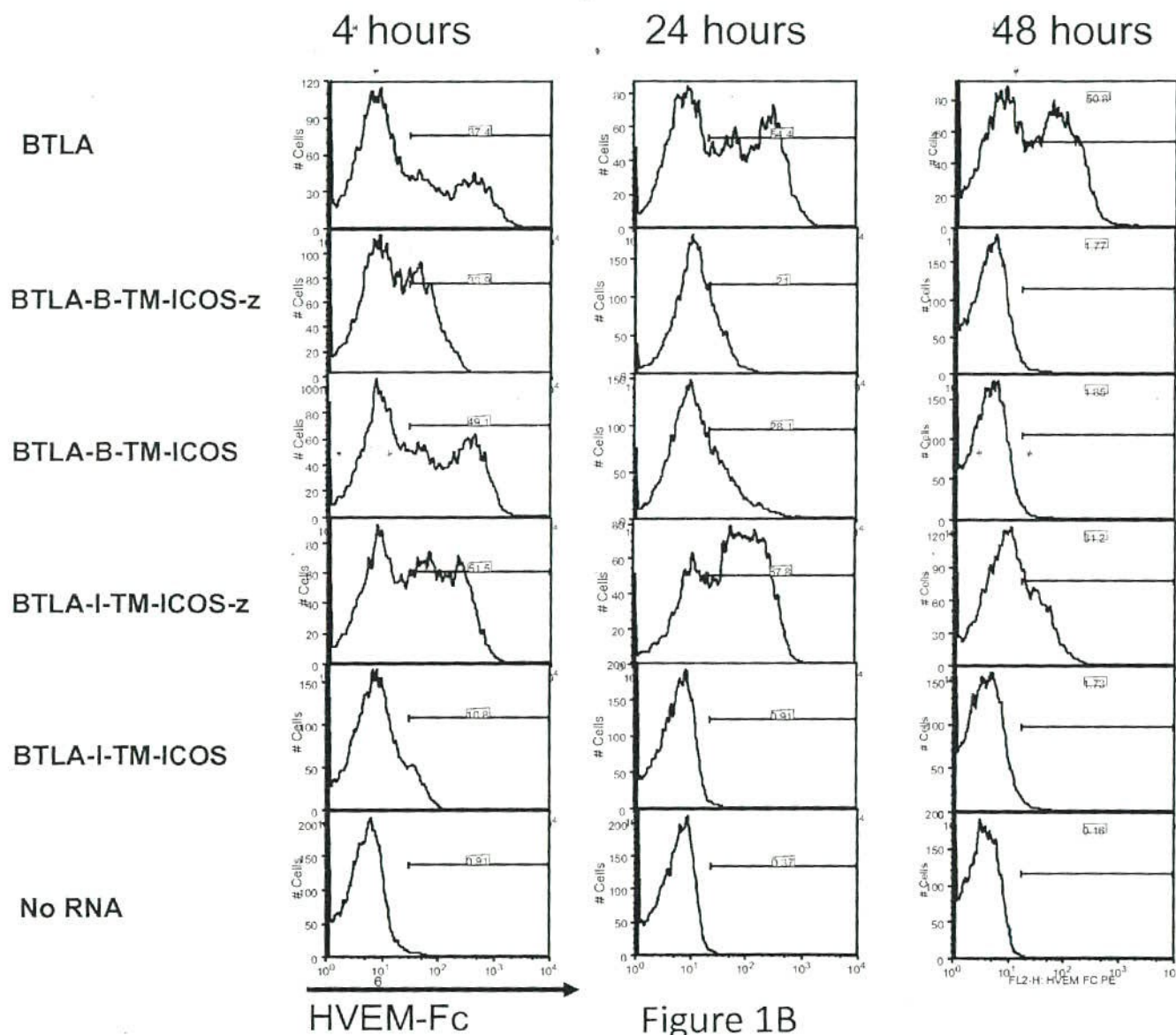


Figure 1B

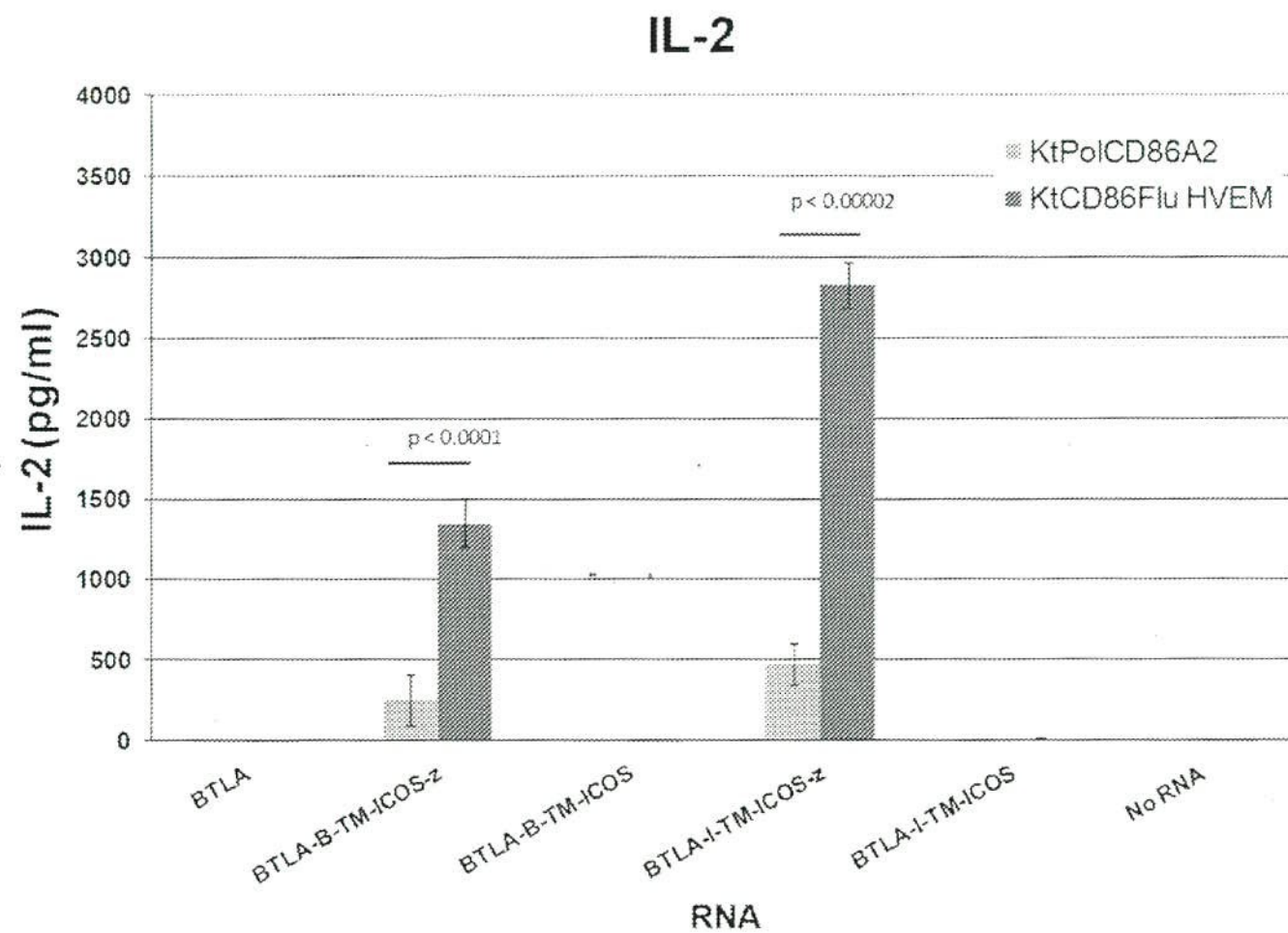


Figure 1C

4/23

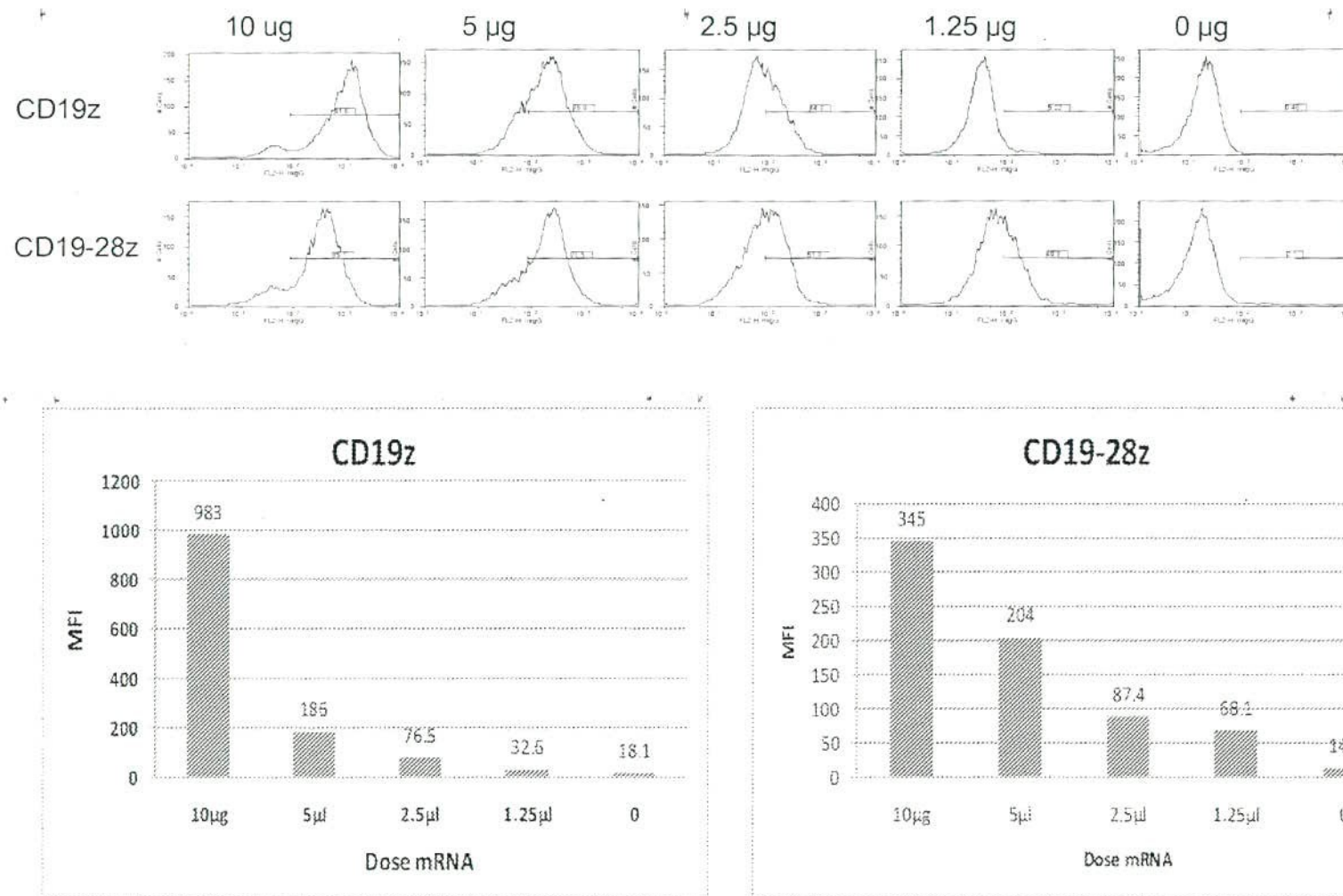


Figure 2A

5/23

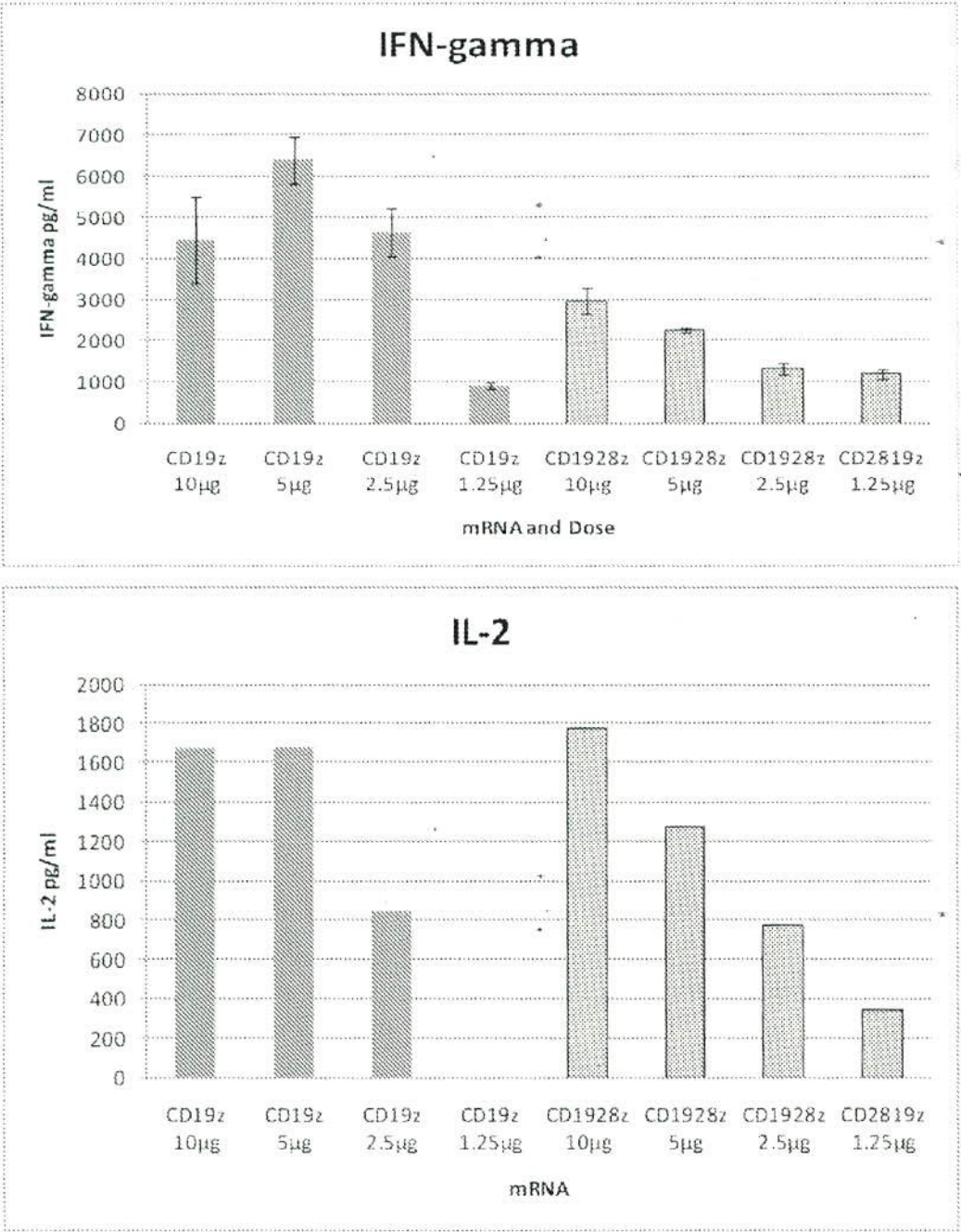


Figure 2B

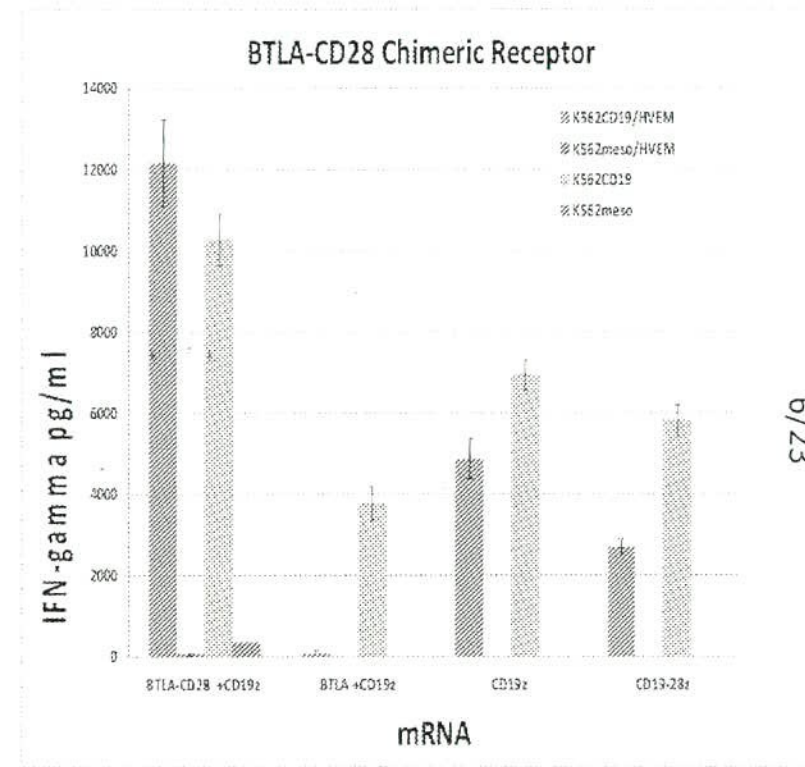
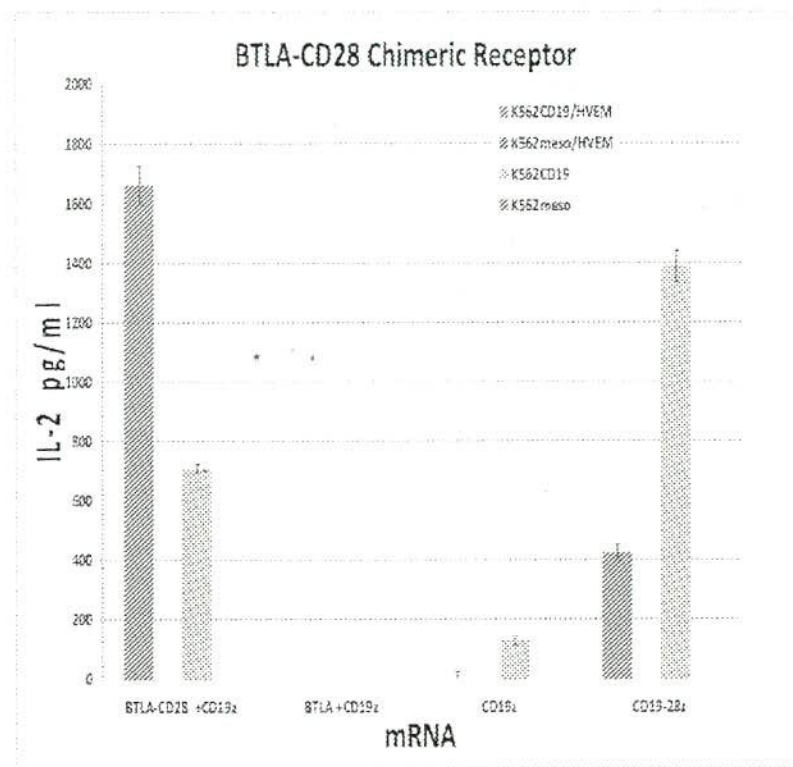


Figure 2C

6/23

Group	Treatment	Co-culture	Cytokines
1	BTLA-BTM-ICOS+CD19z	K562CD19-HVEM	Th17 cytokine cocktail
2	BTLA-BTM-ICOS+CD19z	K562CD19-HVEM	Th17 cytokine cocktail
3	BTLA-BTM-ICOS	HVEM-Fc/OKT3	Th17 cytokine cocktail
4	BTLA- BTM-CD28 +CD19z	K562CD19-HVEM	Th17 cytokine cocktail
5	CD3/ICOS beads	No	Th17 cytokine cocktail
6	CD3/CD28 beads	No	Th17 cytokine cocktail

Donor ND 365; Fresh CD4⁺ Cells

Th17 cytokine cocktail

- IL-1 β 10ng/ml
- IL-6 10ng/ml
- IL-23 20ng/ml
- Anti-IL-4 10 μ g/ml
- Anti-IFN γ 10 μ l/ml
- IL-2 50u/ml (start day5)

Figure 3A

7/23

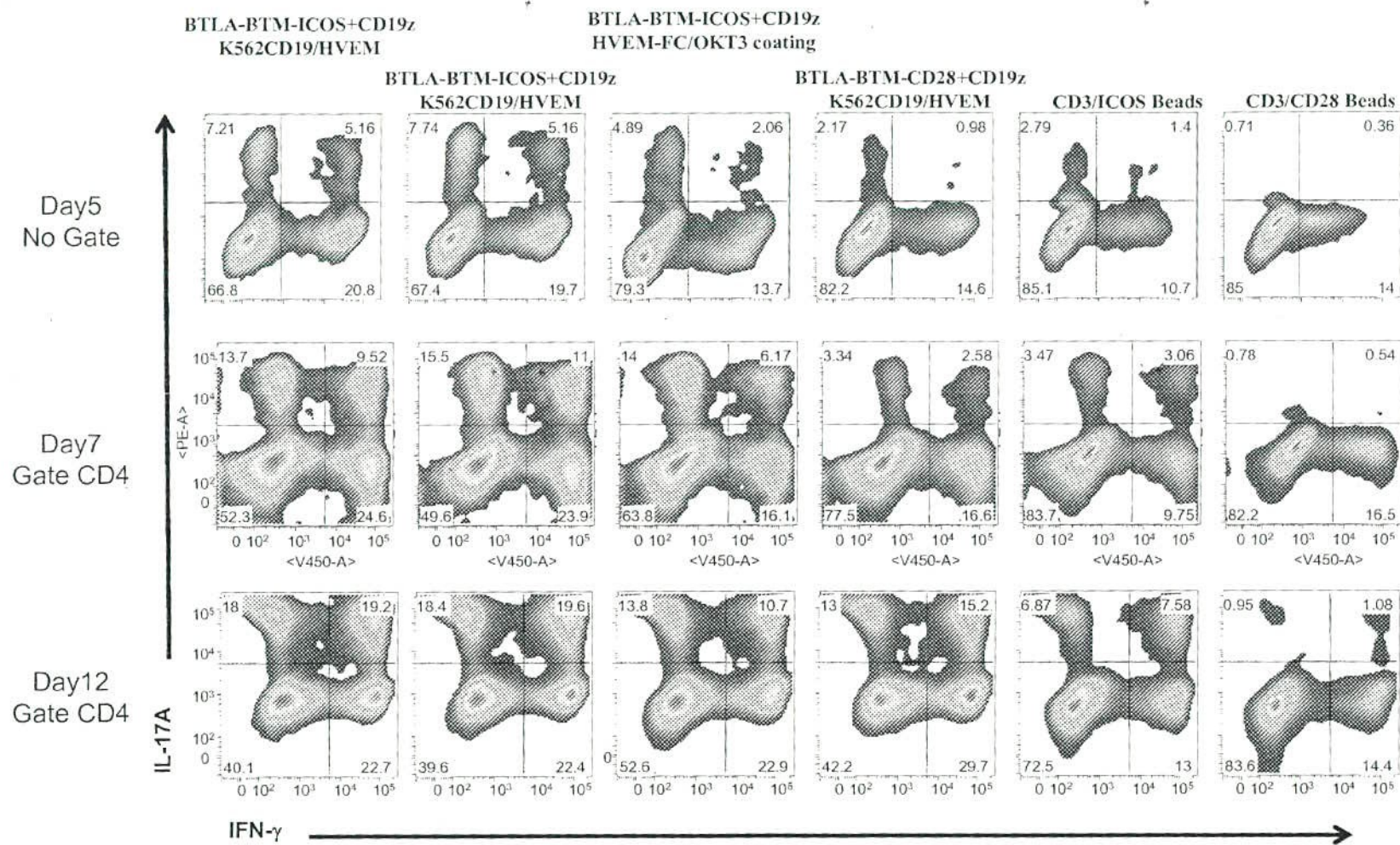
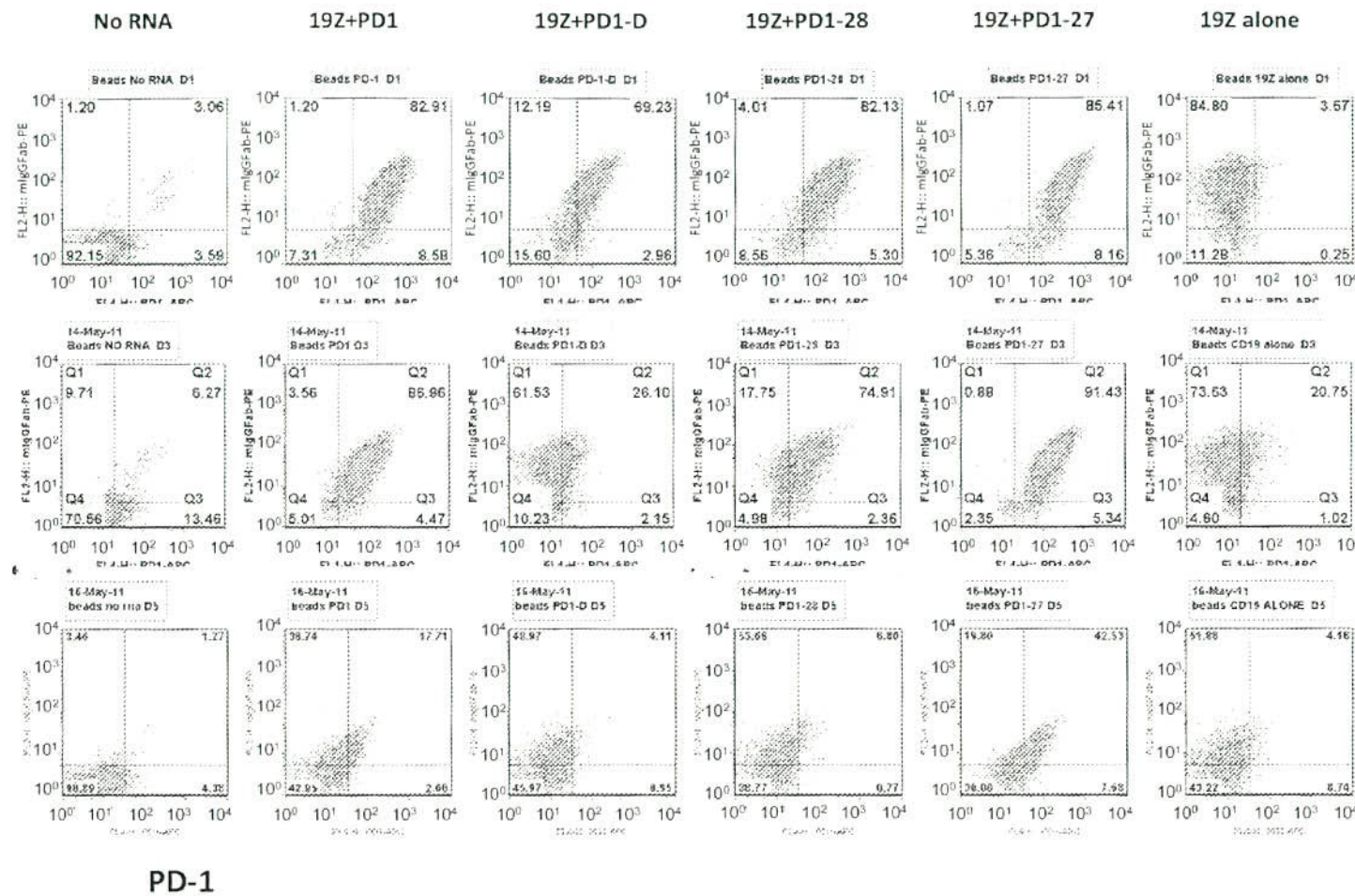


Figure 3B

8/23

CAR (19-BBZ)



PD-1

Figure 4A

9/23

100

10/23

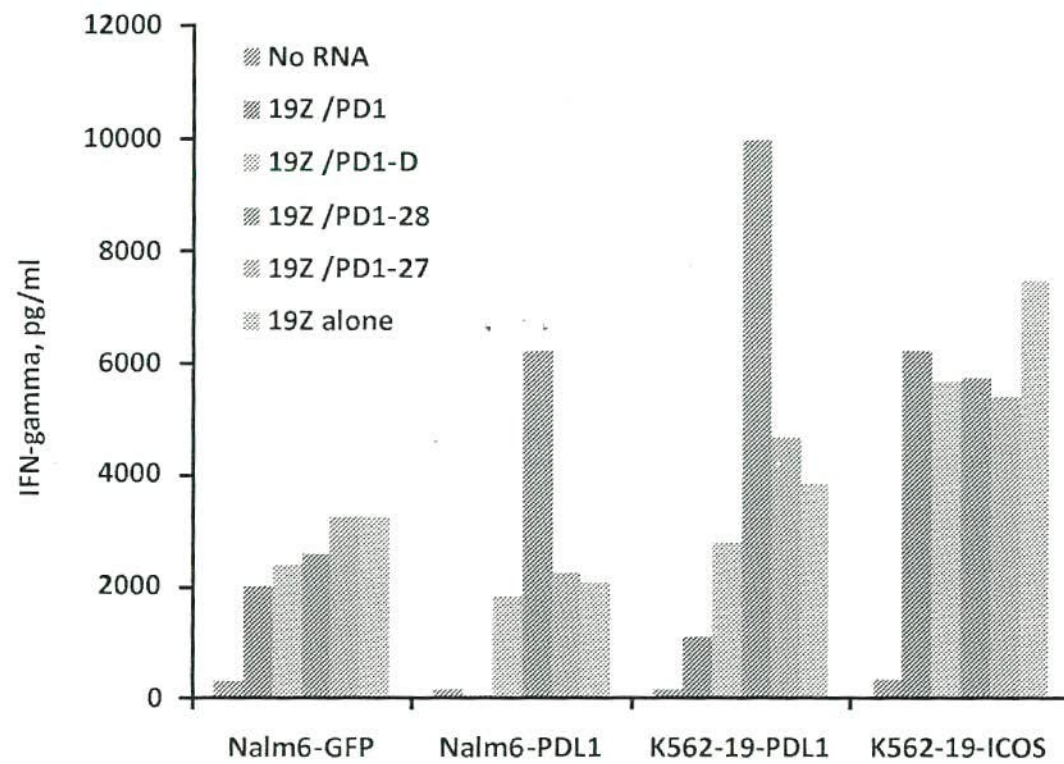


Figure 4B

11/23

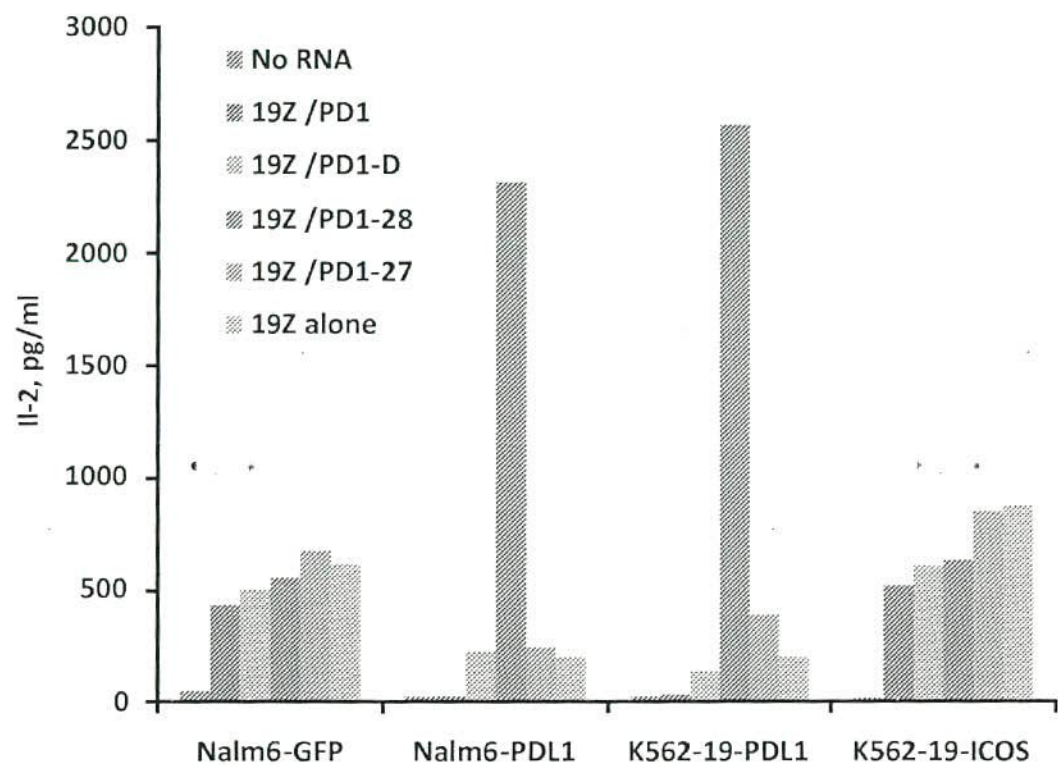


Figure 4C

109

12/23

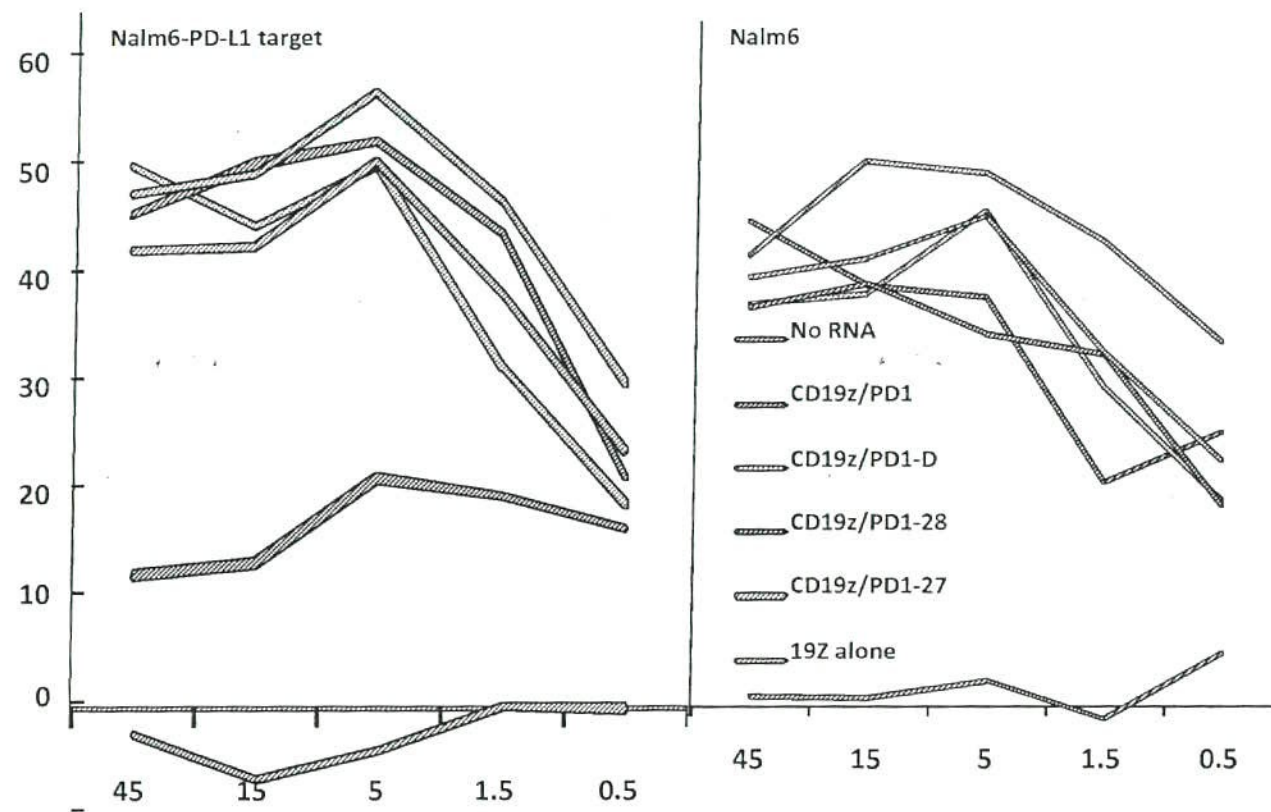


Figure 4D

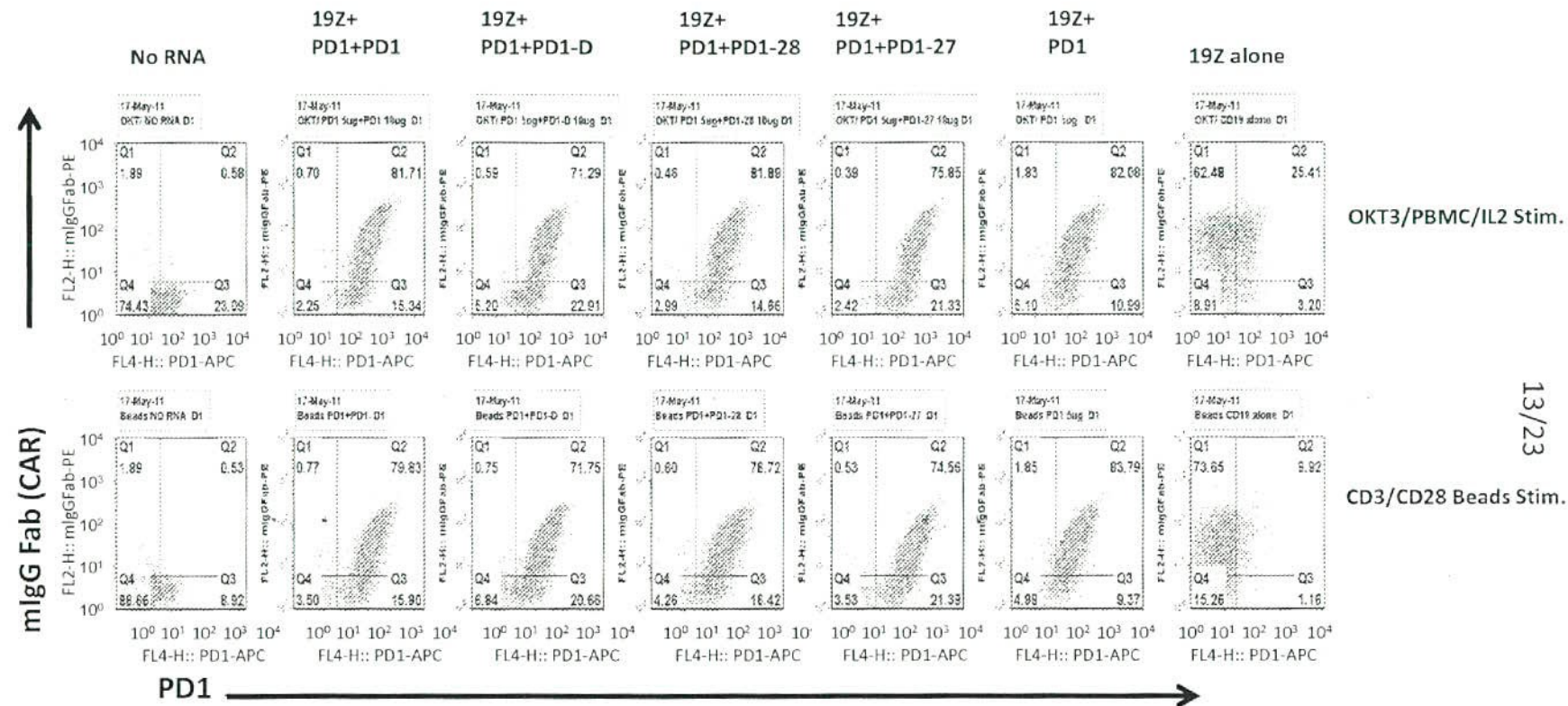


Figure 5A

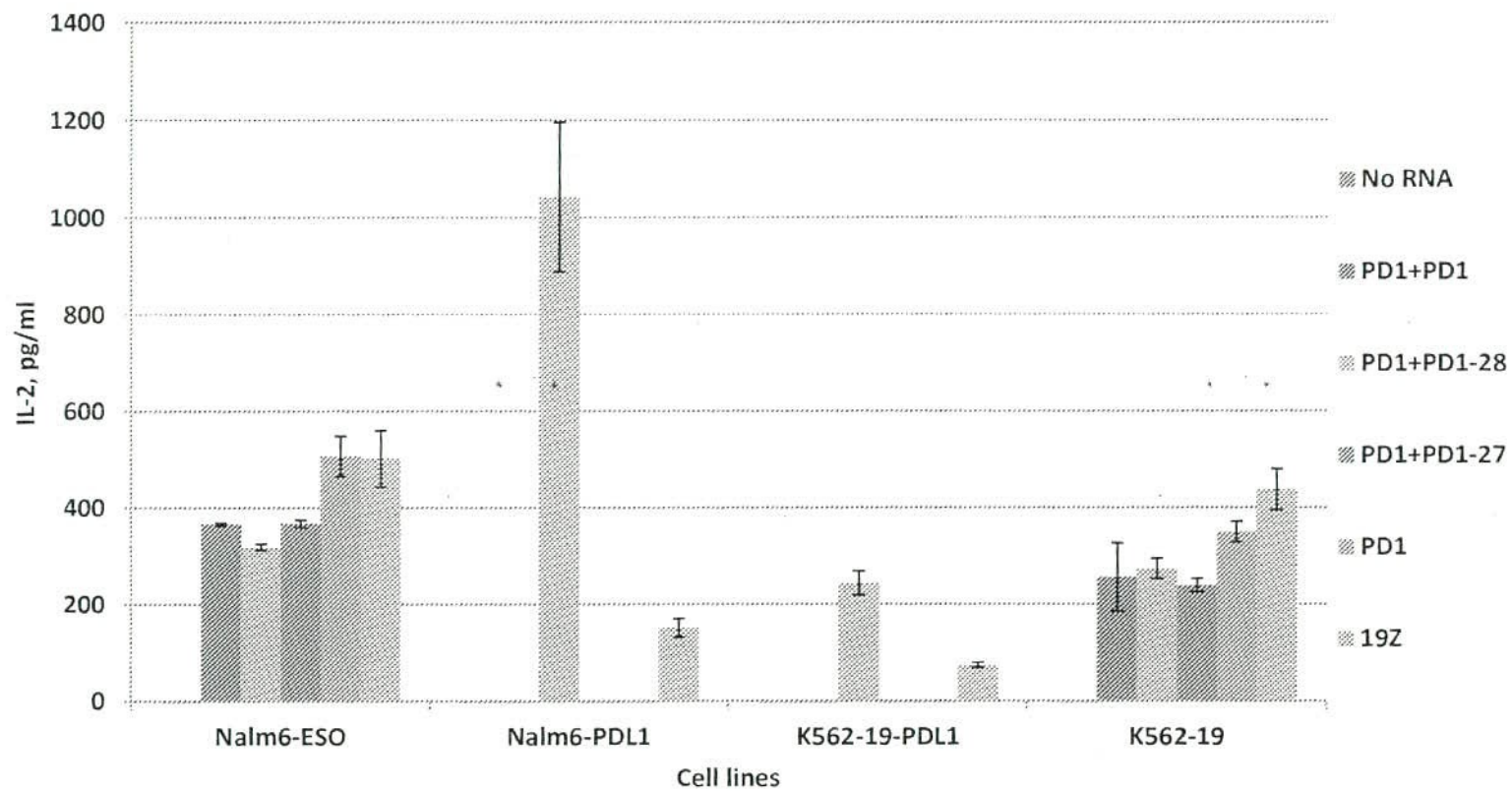


Figure 5B

14/23

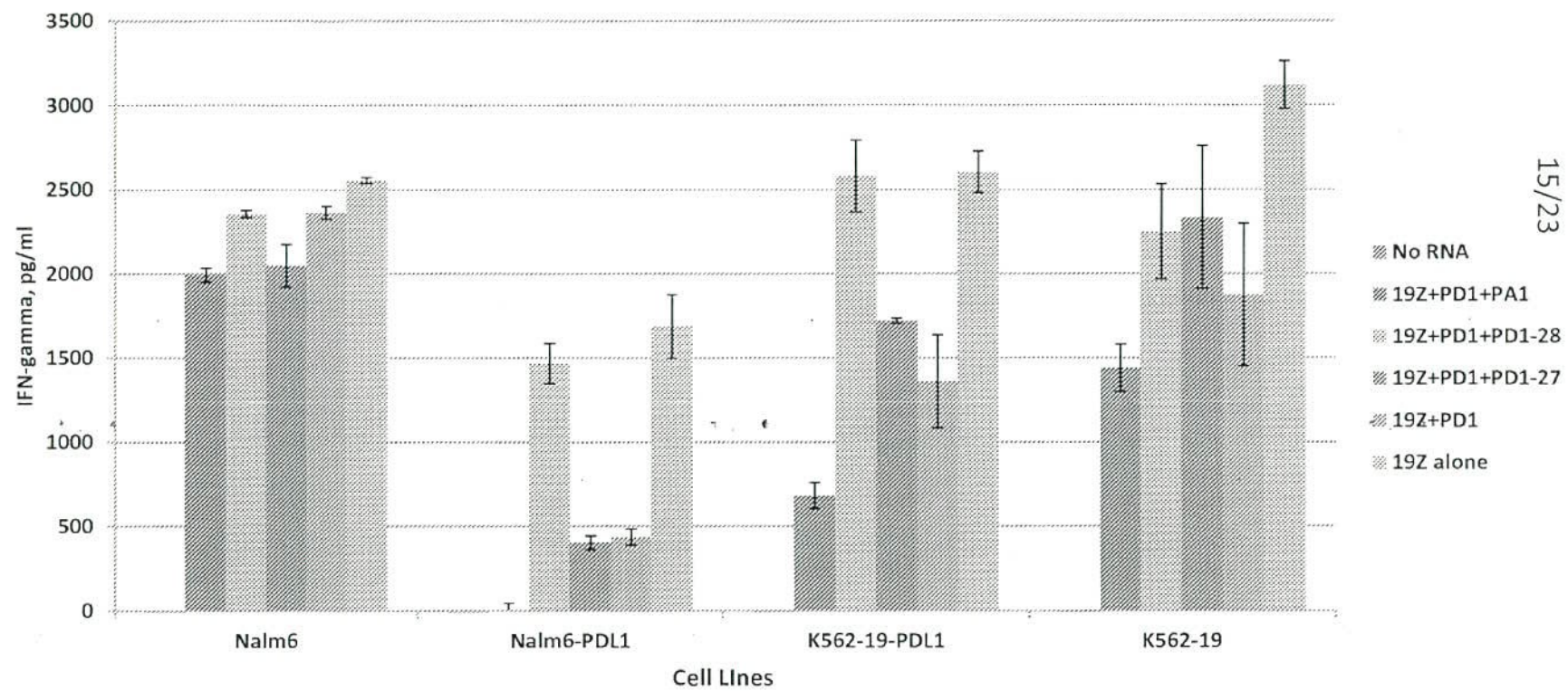


Figure 5C

16/23

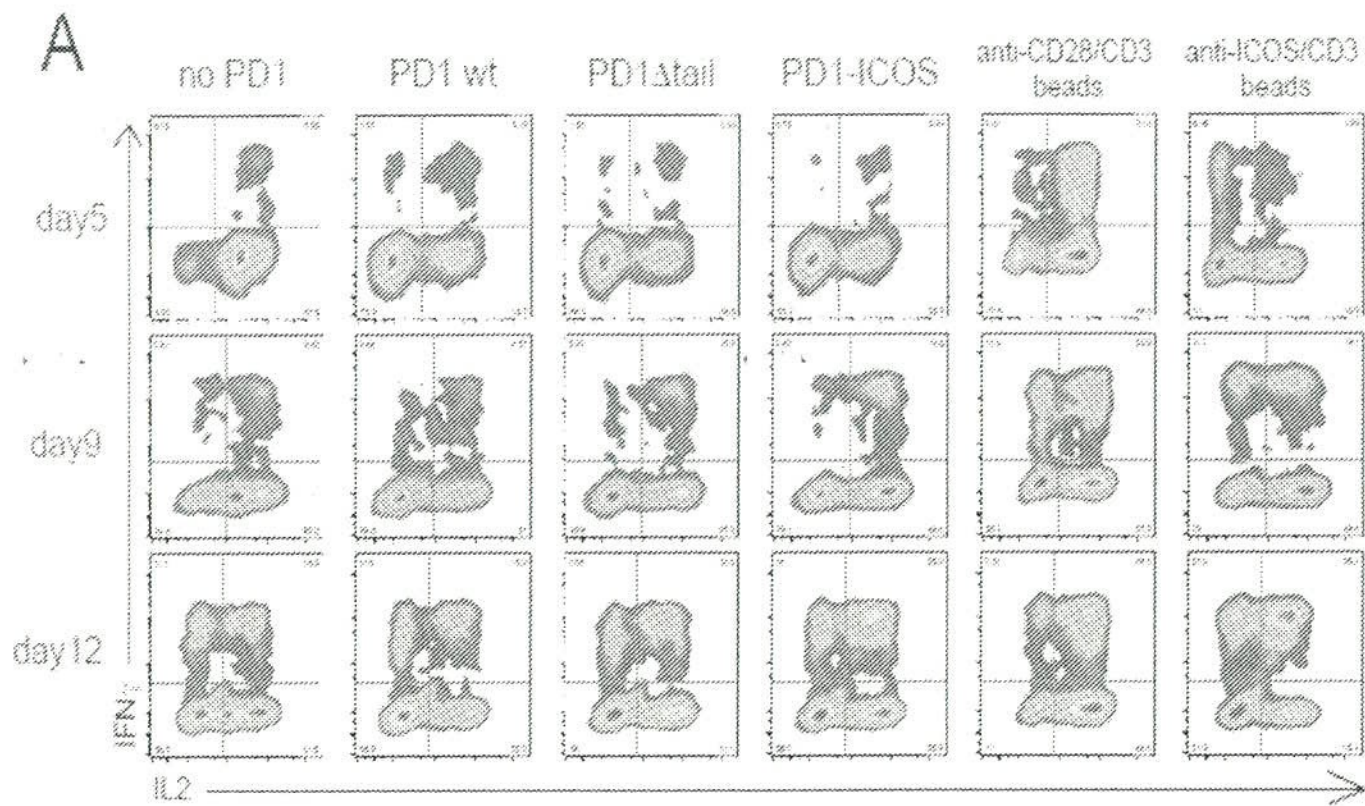


Figure 6A

17/23

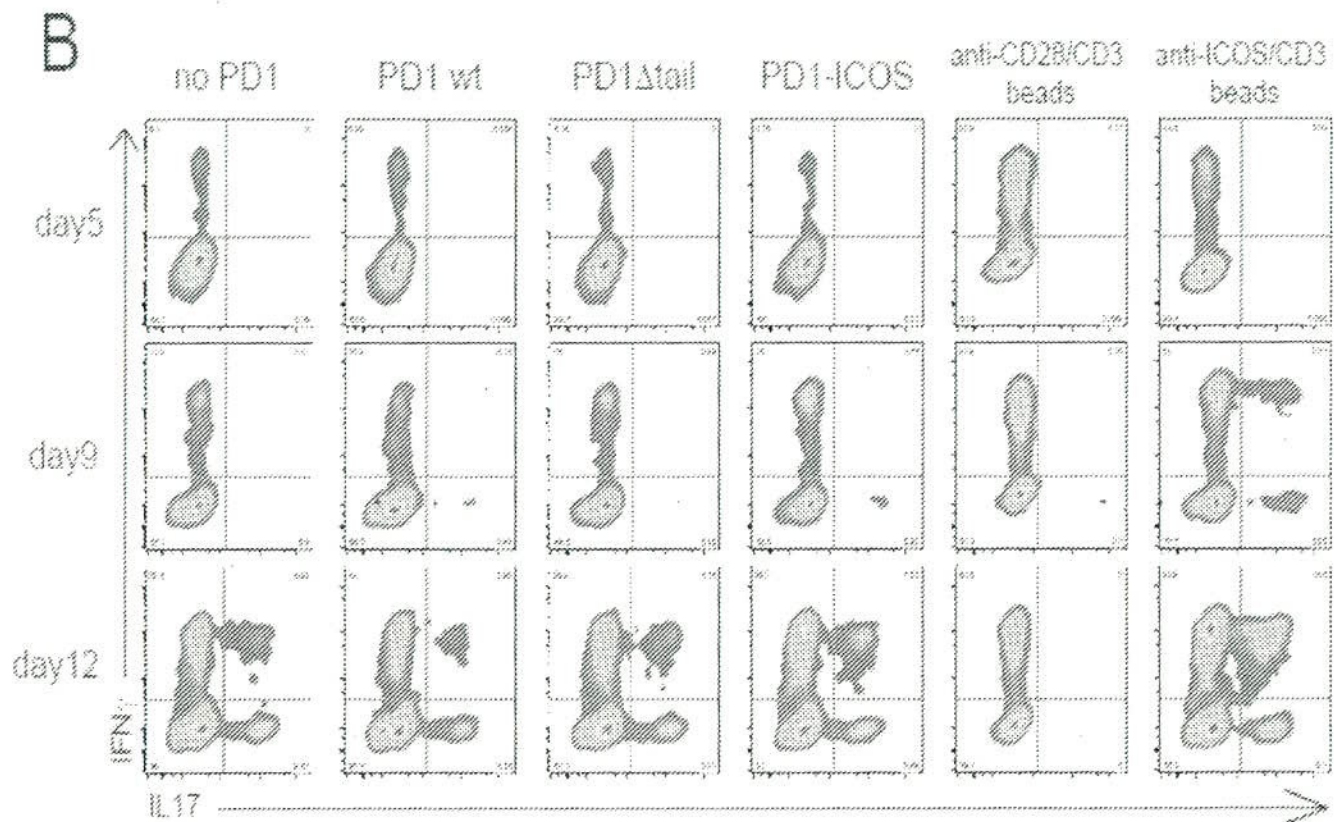


Figure 6B

18/23

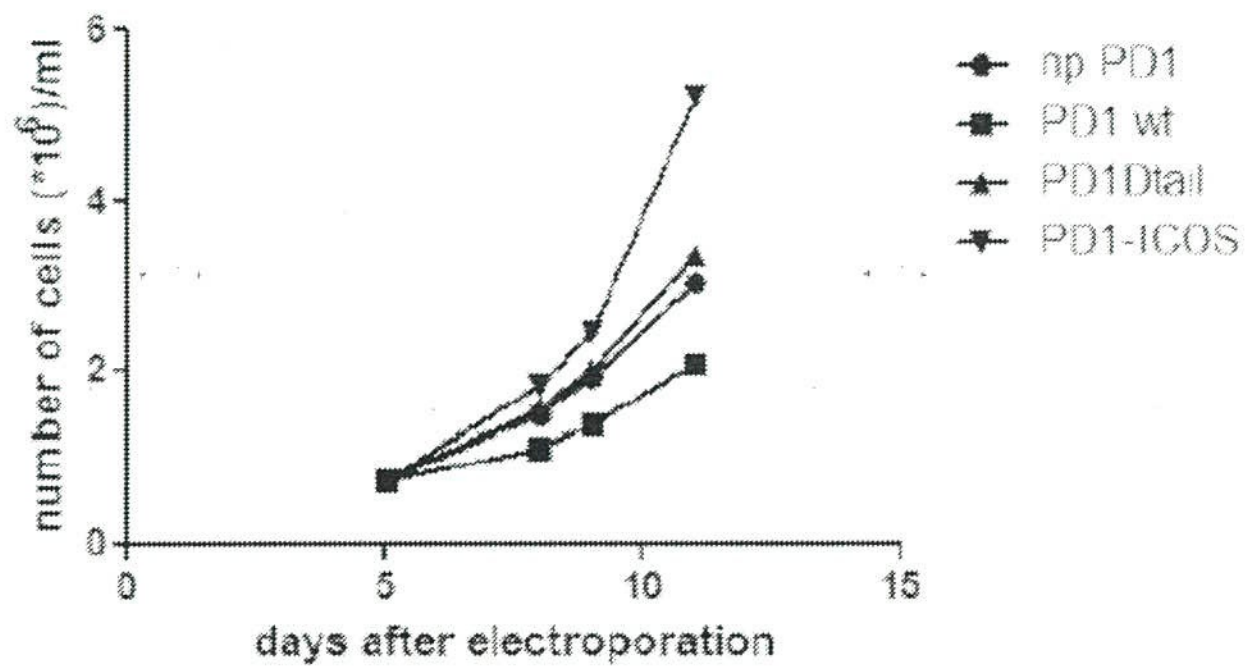


Figure 6C

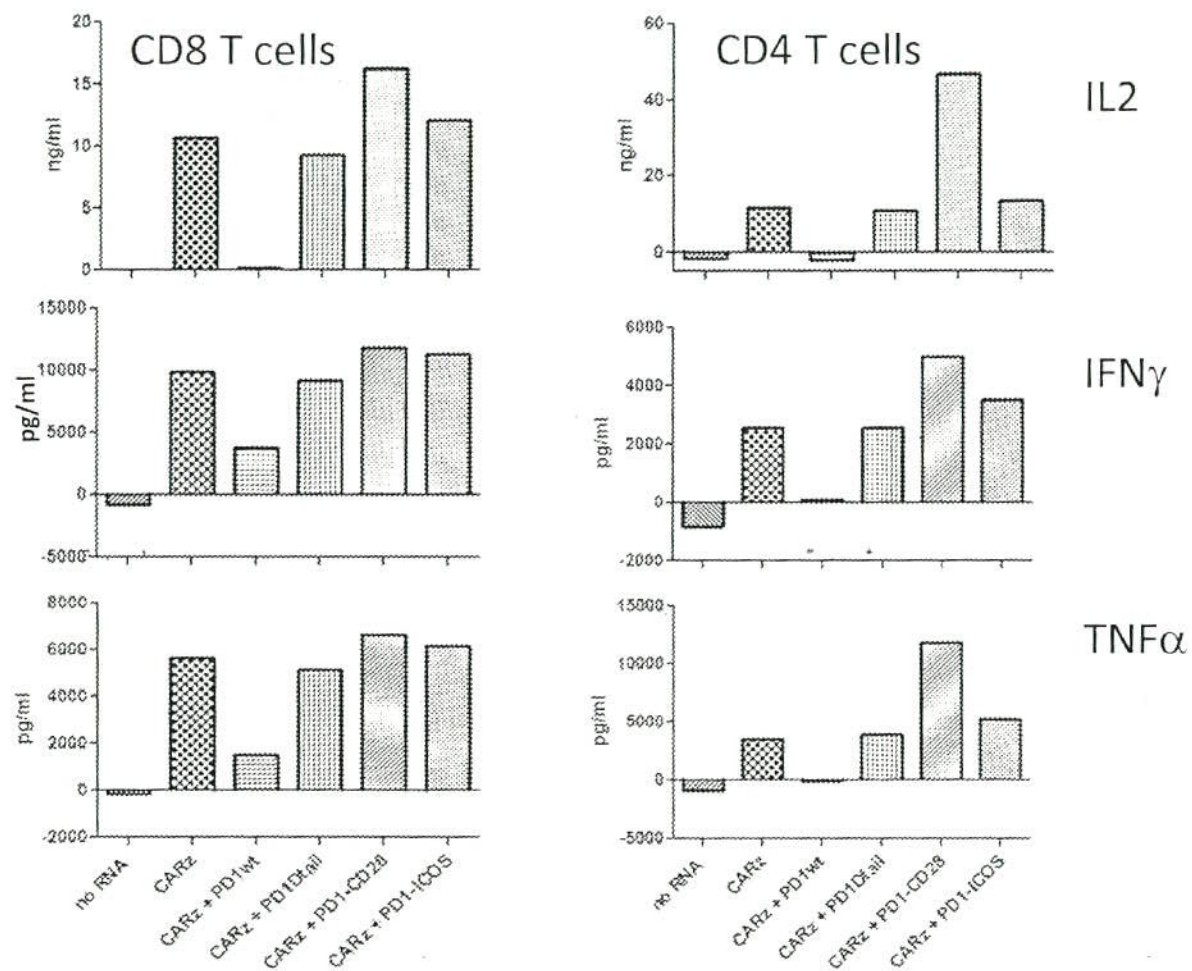
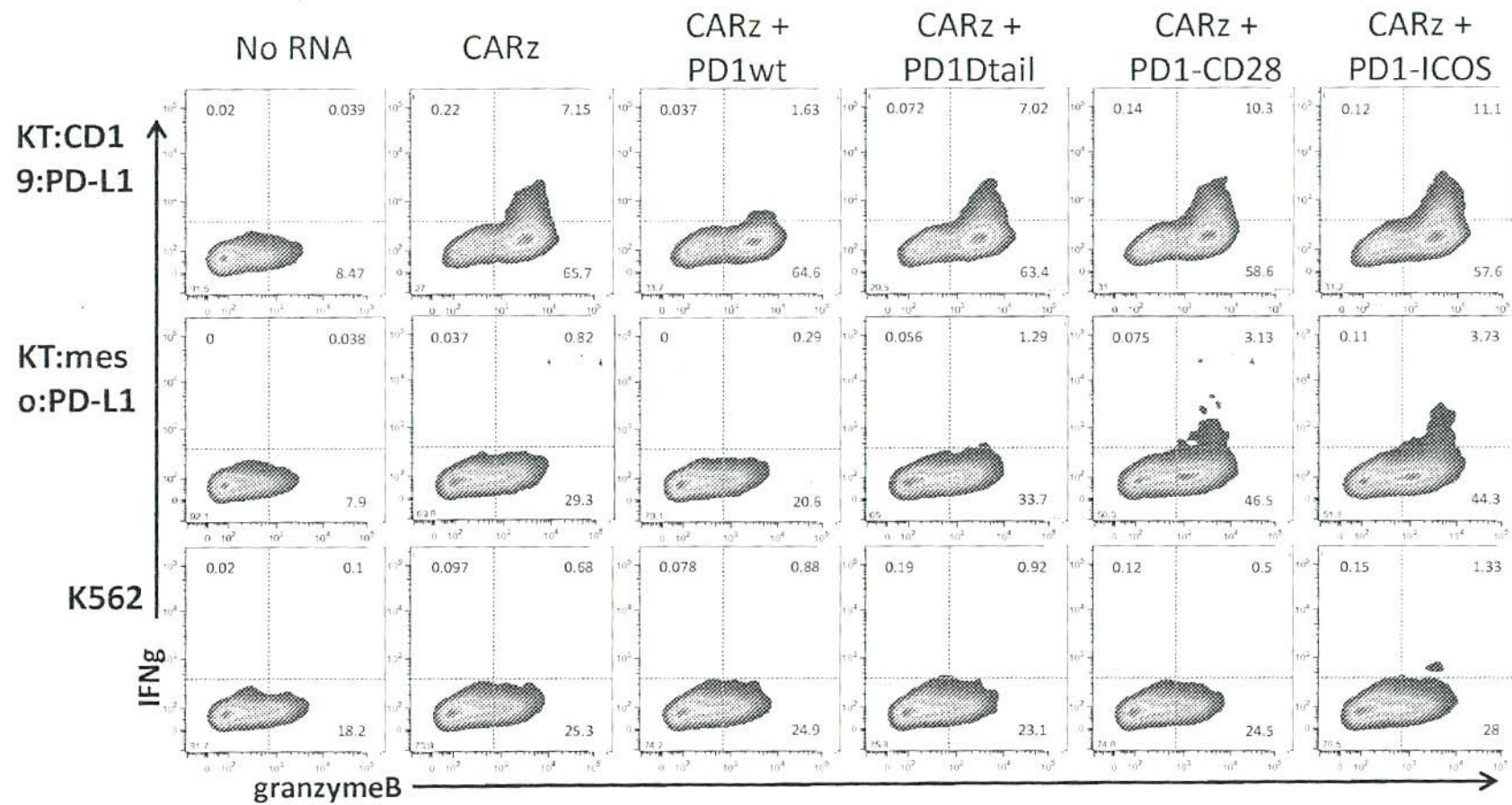


Figure 7

19/23



20/23

Figure 8

21/23

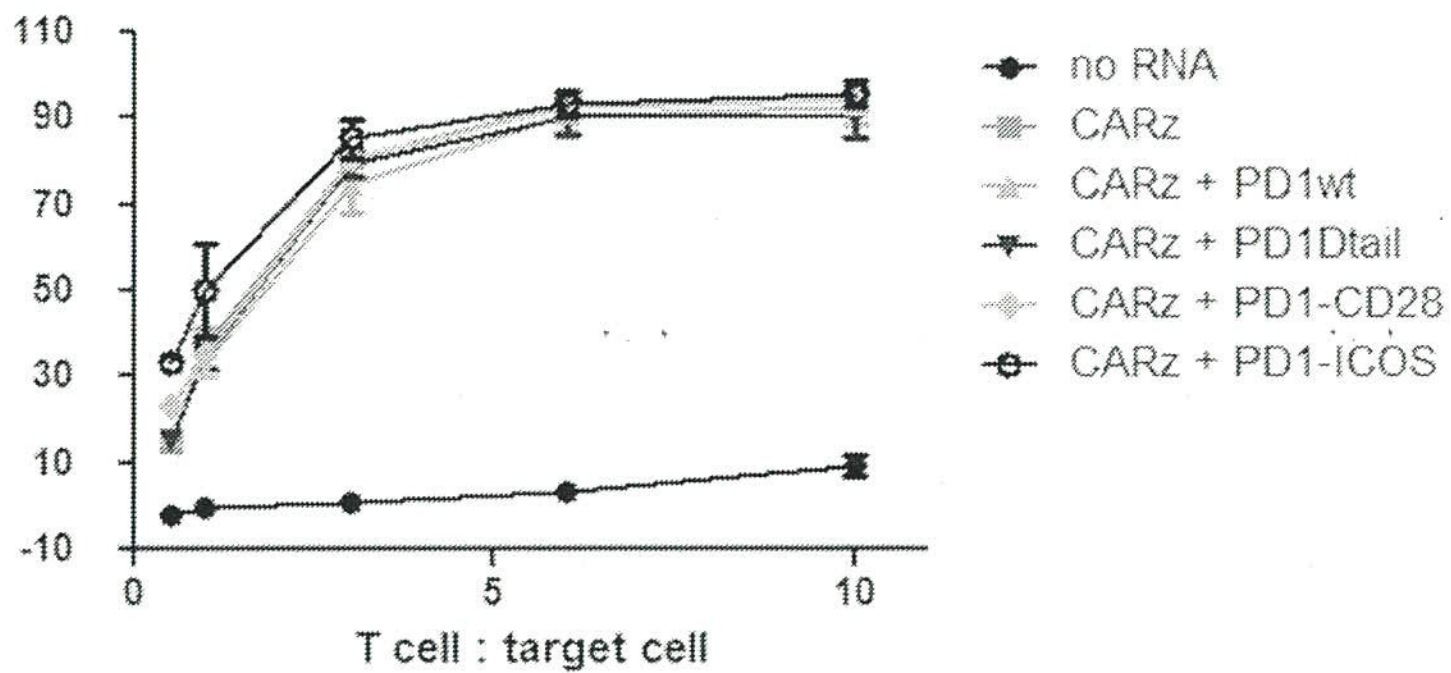


Figure 9

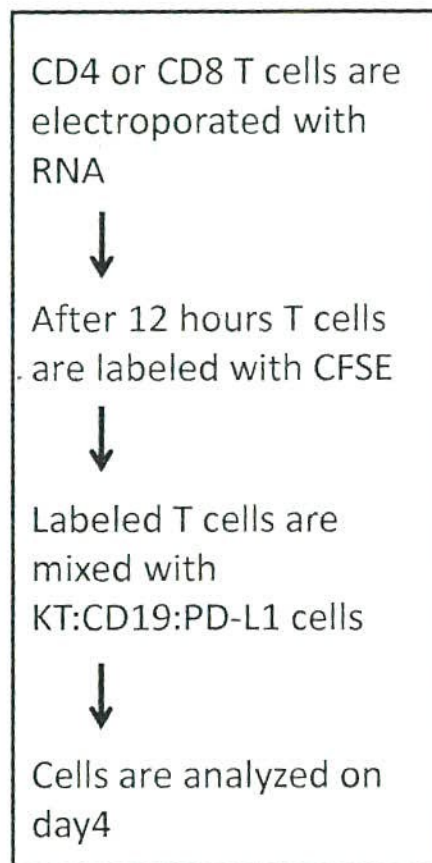
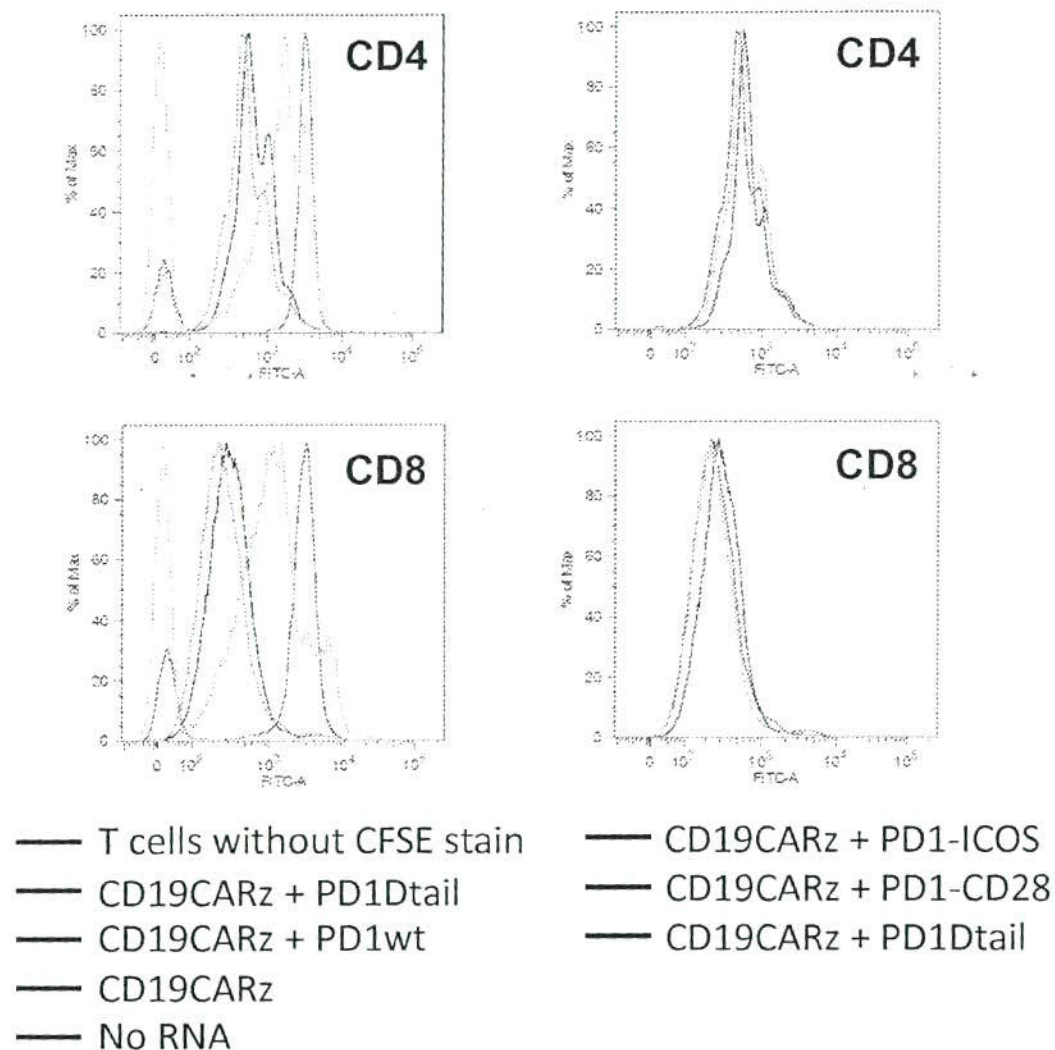


Figure 10



22/23

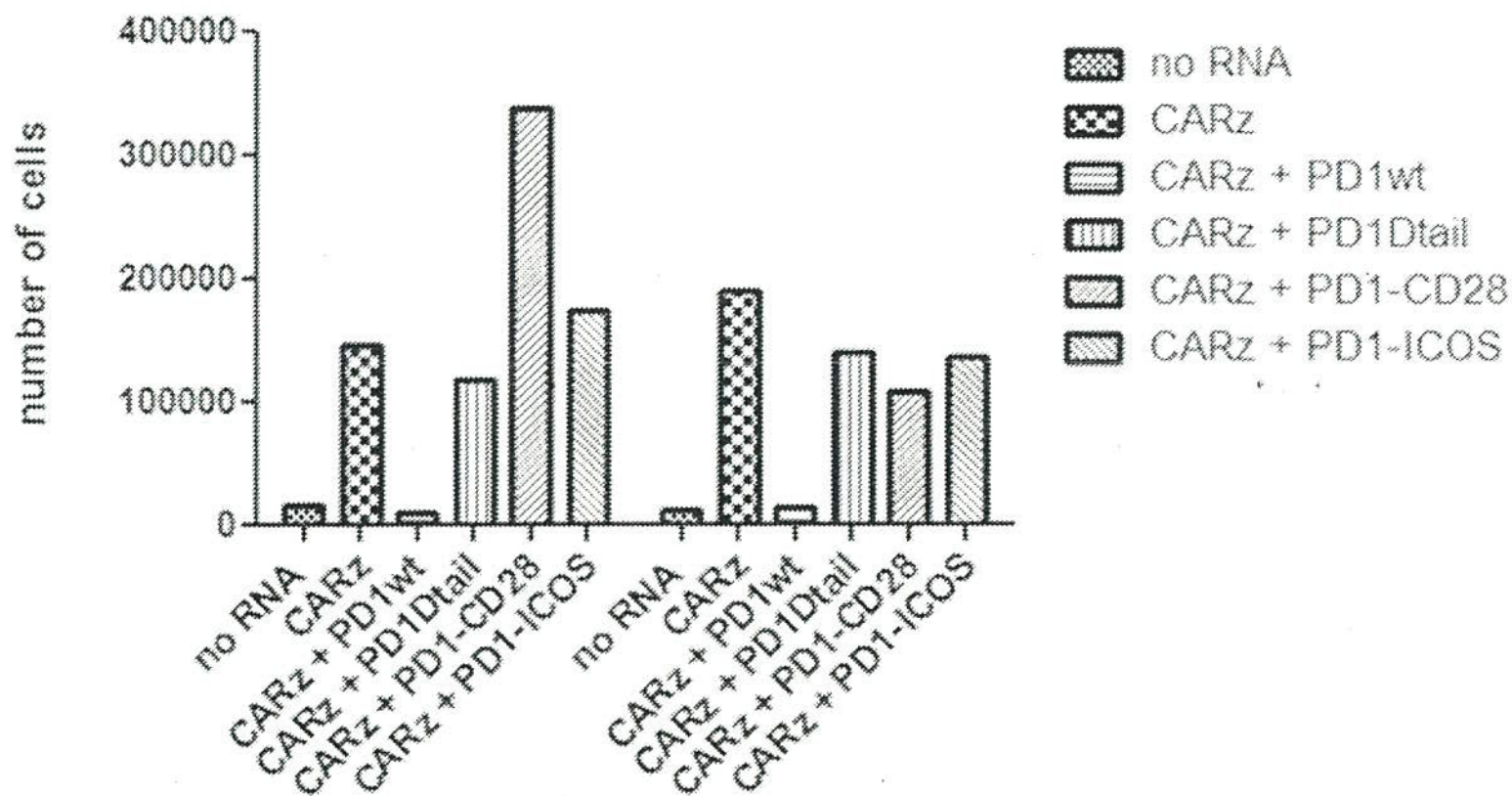


Figure 11

23/23

SEQUENCE LISTING

<110> THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA
June, Carl H
Zhao, Yangbing

<120> SWITCH COSTIMULATORY RECEPTORS

<130> 046483-6010-00-WO.601501

<150> US 61/513,259
<151> 2011-07-29

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 870
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Chemically synthesized

<400> 1
atgaagacat tgcctgccat gcttggaact gggaaattat tttgggtctt cttcttaatc 60
ccatatctgg acatctggaa catccatggg aaagaatcat gtgatgtaca gctttatata 120
aagagacaat ctgaacactc catcttagca ggagatccct ttgaactaga atgccctgtg 180
aaatactgtg ctaacaggcc tcatgtgact tggtgcaagc tcaatggaac aacatgtgta 240
aaacttgaag atagacaaac aagttggaag gaagagaaga acatttcatt tttcattcta 300
cattttgaac cagtgtcttc taatgacaat gggtcatacc gctgttctgc aaattttcag 360
tctaattctca ttgaaagcca ctcaacaact ctttatgtga cagatgtaaa aagtgcctca 420
gaacgacctt ccaaggacga aatggcaagc agacctggc tctgtatag ttacttctc 480
ttgggggggat tgcctctact catcactacc tgtttctgcg tgttctgctg cctgagaagg 540
caccaaggaa agcaaaatga actctctgac acagcaggag gggaaattaa cctggttgat 600
gctcacctta agagttagca aacagaagca agcaccaggc aaaattccca agtactgcta 660
tcagaaactg gaatttatga taatgacctt gacctttgtt tcaggatgca ggaagggctc 720
gaagtttatt ctaatccatg cctggaagaa aacaaaccag gcattgttta tgcttcctg 780
aaccattctg tcattggacc gaactcaaga ctggcaagaa atgtaaaaga agcaccaaca 840
gaatatgcat ccatatgtgt gaggagttaa 870

<210> 2
<211> 685
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Chemically synthesized

<400> 2

aagcttgccg ccatgaagac attgcctgcc atgcttgga ctgggaaatt attttgggtc	60
ttcttcttaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaaagaatc atgtgatgta	120
cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta	180
gcatgccctg tgaaatactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga	240
acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca	300
tttttcattc tacattttga accagtgtt cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct	360
gcaaattttc agtctaactc cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta	420
aaaagtgcct cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gctcctgtat	480
agtttacttc ctttgggggg attgcctcta ctcatcacta cctgtttctg cctgttctgc	540
tgcttgagg agtaagagga gcaggtcct gcacagtgc tacatgaaca tgactccccg	600
ccgccccggg cccaccgca agcattacca gccctatgcc ccaccacgcg acttcgcagc	660
ctatcgctcc tgataagcgg ccgca	685

<210> 3

<211> 701

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Chemically synthesized

<400> 3

aagcttgccg ccatgaagac attgcctgcc atgcttgga ctgggaaatt attttgggtc	60
ttcttcttaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaaagaatc atgtgatgta	120
cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta	180
gaatgccctg tgaaatactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga	240
acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca	300
tttttcattc tacattttga accagtgtt cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct	360
gcaaattttc agtctaactc cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta	420
aaaagtgcct cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gctcctgtat	480
agtttacttc ctttgggggg attgcctcta ctcatcacta cctgtttctg cctgttctgc	540
tgcttgaag gaaatataga tcaaacaag gagaaagtc tgtggagcct gcagagcctt	600
gtcgttacag ctgccccagg gaggaggagg gcagcaccat ccccatccag gaggattacc	660

gaaaaccgga gcctgcctgc tccccctgat aagcggccgc a 701

<210> 4
<211> 685
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Chemically synthesized

<400> 4
aagcttgccg ccatgaagac attgcctgcc atgcttgga ctgggaaatt attttgggtc 60
ttcttcttaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaaagaatc atgtgatgta 120
cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta 180
gaatgccctg tgaaatactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga 240
acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca 300
tttttcattc tacattttga accagtgcct cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct 360
gcaaattttc agtctaactc cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta 420
aaaagtgcct cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gctcctgtat 480
agtttctggt taccatagg atgtgcagcc tttgtttag tctgcatttt gggatgcata 540
cttattgagg agtaagagga gcaggctcct gcacagtgcac tacatgaaca tgactccccg 600
ccgccccggg ccacccgcga agcattacca gccctatgcc ccaccacgcg acttcgcagc 660
ctatcgctcc tgataagcgg ccgca 685

<210> 5
<211> 701
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Chemically synthesized

<400> 5
aagcttgccg ccatgaagac attgcctgcc atgcttgga ctgggaaatt attttgggtc 60
ttcttcttaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaaagaatc atgtgatgta 120
cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta 180
gaatgccctg tgaaatactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga 240
acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca 300
tttttcattc tacattttga accagtgcct cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct 360
gcaaattttc agtctaactc cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta 420
aaaagtgcct cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gctcctgtat 480

agtttctggt tacccatagg atgtgcagcc tttgtttag tctgcatttt gggatgcata	540
cttattgaag gaaatataga tcaaacaaag gagaaagtcc tgtggagcct gcagagcctt	600
gtcgtttacag ctgccccagg gaggaggagg gcagcaccat ccccatccag gaggattacc	660
gaaaaccgga gcctgcctgc tccccctgat aagcggccgc a	701

<210> 6
 <211> 672
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Chemically synthesized

<400> 6	
aagcttgccg ccatgaagac attgcctgcc atgcttggaa ctgggaaatt attttgggtc	60
ttctttcttaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaaagaatc atgtgatgta	120
cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta	180
gaatgccctg tgaaatactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga	240
acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca	300
tttttcattc tacattttga accagtgcct cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct	360
gcaaattttc agtctaactc cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta	420
aaaagtgcct cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gctcctgtat	480
agtttacttc ctttgggggg attgcctcta ctcatcacta cctgtttctg cctgttctgc	540
tgcctgtgtt ggcttacaaa aaagaagtat tcatccagtg tgcacgacc taacgggtgaa	600
tacatgttca tgagagcagt gaacacagcc aaaaaatcta gactcacaga tgtgacccta	660
taagcgcccg ca	672

<210> 7
 <211> 1011
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Chemically synthesized

<400> 7	
aagcttgccg ccatgaagac attgcctgcc atgcttggaa ctgggaaatt attttgggtc	60
ttctttcttaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaaagaatc atgtgatgta	120
cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta	180
gaatgccctg tgaaatactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga	240

acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca 300
tttttcattc tacattttga accagtgtt cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct 360
gcaaattttc agtctaattct cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta 420
aaaagtgcct cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gtcctgtat 480
agtttacttc ctttgggggg attgcctcta ctcatcacta cctgtttctg cctgttctgc 540
tgctgtgtt ggcttacaaa aaagaagtat tcatccagtg tgcacgaccc taacgggtgaa 600
tacatgttca tgagagcagt gaacacagcc aaaaaatcta gactcacaga tgtgacccta 660
tgcagagtga agttcagcag gagcgagac gccccgcgt accagcagg ccagaaccag 720
ctctataacg agtctaattct aggacgaaga gaggagtacg atgttttga caagagacgt 780
ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg agaaggaaga accctcagga aggcctgtac 840
aatgaactgc agaaagataa gatggcggag gcctacagt agattgggat gaaaggcgag 900
cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac 960
acctacgacg cccttcacat gcaggccctg cccctcgt aagcggccgc a 1011

<210> 8
<211> 672
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Chemically synthesized

<400> 8
aagcttgccg ccatgaagac attgcctgcc atgcttgga ctgggaaatt attttgggtc 60
ttcttcttaa toccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaaagaatc atgtgatgta 120
cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta 180
gaatgccctg tgaaatactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga 240
acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca 300
tttttcattc tacattttga accagtgtt cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct 360
gcaaattttc agtctaattct cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta 420
aaaagtgcct cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gtcctgtat 480
agtttctggt taccatagg atgtgcagcc tttgtttag tctgcatttt gggatgcata 540
cttatttggt ggcttacaaa aaagaagtat tcatccagtg tgcacgaccc taacgggtgaa 600
tacatgttca tgagagcagt gaacacagcc aaaaaatcta gactcacaga tgtgacccta 660
taagcggccg ca 672

<210> 9
 <211> 1011
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Chemically synthesized
 <400> 9
 aagcttgccg ccatgaagac attgcctgcc atgcttggaa ctgggaaatt attttgggtc 60
 ttcttcttaa tcccatatct ggacatctgg aacatccatg ggaaagaatc atgtgatgta 120
 cagctttata taaagagaca atctgaacac tccatcttag caggagatcc ctttgaacta 180
 gaatgcctg tgaaatactg tgctaacagg cctcatgtga cttggtgcaa gctcaatgga 240
 acaacatgtg taaaacttga agatagacaa acaagttgga aggaagagaa gaacatttca 300
 tttttcattc tacattttga accagtgcct cctaatagaca atgggtcata ccgctgttct 360
 gcaaattttc agtctaactc cattgaaagc cactcaacaa ctctttatgt gacagatgta 420
 aaaagtgcct cagaacgacc ctccaaggac gaaatggcaa gcagaccctg gctcctgtat 480
 agtttacttc ctttgggggg attgcctcta ctcactacta cctgtttctg cctgtttctgc 540
 tgctgtgtt ggcttacaaa aaagaagtat tcatccagtg tgcacgaccc taacggtgaa 600
 tacatgttca tgagagcagt gaacacagcc aaaaaatcta gactcacaga tgtgacccta 660
 tgcagagtga agttcagcag gagcgcagac gccccgcgt accagcaggg ccagaaccag 720
 ctctataacg agctcaatct aggacgaaga gaggagtacg atgttttga caagagacgt 780
 ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg agaaggaaga accctcagga aggcctgtac 840
 aatgaactgc agaaagataa gatggcggag gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag 900
 cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac 960
 aectacgacg cccttcacat gcaggccctg cccctcgtct aagcggccgc a 1011

<210> 10
 <211> 690
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Chemically synthesized
 <400> 10
 atgcagatcc cacaggcgc ctggccagtc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg 60
 ccaggatggt tcttagactc ccagacagg ccctggaacc ccccccacct cccccagcc 120
 ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 180
 gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 240

gccttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg	300
cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc	360
tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca	420
gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccaccccag cccctcacc	480
aggccagccg gccagttcca aaccctgggtg ttctgggttac ccataggatg tgcagccttt	540
gttgtagtct gcattttggg atgcatactt atttggtggc ttacaaaaaa gaagtattca	600
tccagtgtgc acgaccctaa cgggtgaatac atgttcatga gagcagtga cacagccaaa	660
aatctagac tcacagatgt gaccctataa	690

<210> 11
 <211> 717
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Chemically synthesized

<400> 11 atgcagatcc cacaggcgcc ctggccagtc gtctgggagg tgctacaact gggctggcgg	60
ccaggatggt tcttagactc ccagacagc ccttgaacc cccacacct ctccccagcc	120
ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg	180
gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc	240
gccttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg	300
cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc	360
tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca	420
gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccaccccag cccctcacc	480
aggccagccg gccagttcca aaccctgggtg ttttgggtgc tgggtggtgt tgggtggagtc	540
ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg gcctttattt ttttctgggt gaggagtaag	600
aggagcaggc tctgcacag tgactacatg aacatgactc ccgcccggcc cgggcccacc	660
cgcaagcatt accagcccta tgccccacca cgcgacttcg cagcctatcg ctccctaa	717

<210> 12
 <211> 720
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Chemically synthesized

<400> 12 atgcagatcc cacaggcgcc ctggccagtc gtctgggagg tgctacaact gggctggcgg	60
---	----

ccaggatggt tcttagactc ccagacagg ccttgaacc cccccacctt ctcccagcc	120
ctgtctgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg	180
gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc	240
gccttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg	300
cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc	360
tacctctgtg gggccatctc cctggcccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca	420
gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccaccccag ccctcacc	480
aggccagccg gccagttcca aacctggtg atccttgtga tcttctctgg aatgttcctt	540
gttttcaccc tggccggggc cctgttcctc catcaacgaa ggaaatatag atcaaacaaa	600
ggagaaagtc ctgtggagcc tgcagagcct tgtcgttaca gctgccccag ggaggaggag	660
ggcāgcacca tcccatcca ggaggattac cgaaaaccgg agcctgcctg ctccccctaa	720

(12) International Application Status Report

Received at International Bureau: 06 August 2012 (06.08.2012)
Report generated on: 14 January 2014 (14.01.2014)

(10) Publication number: WO2013/019615	(43) Publication date: 07 February 2013 (07.02.2013)	(26) Publication language: English (EN)
(21) Application Number: PCT/US2012/048543	(22) Filing Date: 27 July 2012 (27.07.2012)	(25) Filing language: English (EN)
(31) Priority number(s): 61/513,259 (US)	(31) Priority date(s): 29 July 2011 (29.07.2011)	(31) Priority status: Priority document received (in compliance with PCT Rule 17.1)

(51) International Patent Classification:
A61K 48/00 (2006.01); A61K 38/17 (2006.01)

(71) Applicant(s):
THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA [US/US]; Center For Technology Transfer 3160 Chestnut Street, Suite 200 Philadelphia, PA 19104-6283 (US) *(for all designated states except US)*
JUNE, Carl, H. [US/US]; 409 Baird Road Merion Station, PA 19066 (US) *(for US only)*
ZHAO, Yangbing [CN/US]; 23 Doncaster Road Cherry Hill, NJ 08003 (US) *(for US only)*

(72) Inventor(s):
JUNE, Carl, H.; 409 Baird Road Merion Station, PA 19066 (US)
ZHAO, Yangbing; 23 Doncaster Road Cherry Hill, NJ 08003 (US)

(74) Agent(s):
SILVA, Domingos, J.; Riverside Law, LLP 300 Four Falls Corporate Center, Suite 710 300 Conshohocken State Road West Conshohocken, PA 19428 (US)

(54) Title (EN): SWITCH COSTIMULATORY RECEPTORS
(54) Title (FR): RÉCEPTEURS DE COMMUTATION PAR COSTIMULATION

(57) Abstract:
(EN): The present invention relates generally to a fusion protein that when displayed on a cell can convert a negative signal into a positive signal in the cell. The fusion protein is a chimeric protein in that the protein comprises at least two domains, wherein the first domain is a polypeptide that is associated with a negative signal and the second domain is a polypeptide that is associated with a positive signal. Thus, the invention encompasses switch receptors that are able to switch negative signals to positive signals for enhancement of an immune response.
(FR): La présente invention concerne, d'une manière générale, une protéine de fusion qui, quand elle est présentée sur une cellule, peut convertir un signal négatif en signal positif dans la cellule. La protéine de fusion est une protéine chimère car elle comporte au moins deux domaines, le premier domaine étant un polypeptide associé à un signal négatif et le second domaine étant un polypeptide associé à un signal positif. L'invention concerne donc des récepteurs de commutation capables de changer des signaux négatifs en signaux positifs pour renforcer une réponse immunitaire.

International search report:
Not available [US]

International Report on Patentability (IPRP) Chapter II of the PCT:
Not available

(81) Designated States:

AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, 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

European Patent Office (EPO) : 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

African Intellectual Property Organization (OAPI) : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

African Regional Intellectual Property Organization (ARIPO) : BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW

Eurasian Patent Organization (EAPO) : AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM



No. 14-012252-00000-0000

Fecha: 2014-01-22 16:11:59 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 112

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art. 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Descripción de la invención
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
 - ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐