

CAPÍTULO REIVINDICATORIO MODIFICADO
(Examen de Forma)

1. Un método de fabricación de una célula que expresa CAR (por ejemplo, una célula efectora inmune que expresa CAR-) o una población de células, que comprende:

Poner en contacto la célula o población de células con un inhibidor de quinasa elegido entre un inhibidor de BTK, un inhibidor CDK4, un inhibidor mTOR, o un inhibidor MNK; e

Introducir (por ejemplo, mediante transducción) un ácido nucleico que codifica una molécula de CAR en la célula o población de células bajo condiciones tales que la molécula de CAR se expresa.

2. El método de la Reivindicación 1, en donde el inhibidor de la quinasa es un inhibidor BTK.

3. El método de la Reivindicación 1 o 2, en donde la molécula de CAR es una molécula CAR que se une a CD19.

4. El método de la Reivindicación 1 o 3, en el que la célula es una célula T o célula NK, o en el que la población de células incluye células T, células NK, o ambos.

5. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, que comprende poner en contacto la célula o población de células con el inhibidor de quinasa para 10-20, 20-30, 30-40, 40-60, o 60-120 minutos y posteriormente eliminar la mayoría o todo el inhibidor de quinasa de la célula o población de células.

6. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1-5, en el que el inhibidor de quinasa se añade después de la célula o población de células se cosecha o antes de la célula o población de células es estimulada.

7. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 2-6, en el que el inhibidor de BTK se elige entre: ibrutinib, GDC-0834, RN-486, CGI-560, CGI-1764, HM-71224, CC-292, ONO-4059, CNX-774, o LFM-A13.
8. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1-7, en el que la población de células comprende también las células cancerosas.
9. El método de la Reivindicación 8, en el que el inhibidor de BTK inhibe un BTK en las células cancerosas.
10. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1-9, que comprende además la depleción de células T reguladoras (por ejemplo, células CD25+) a partir de la población de células.
11. Una mezcla de reacción que comprende una población de células efectoras inmunes, un inhibidor de quinasa elegido entre un inhibidor de BTK, un inhibidor CDK4, un inhibidor mTOR, o un inhibidor MNK, y una molécula de CAR o un ácido nucleico que codifica una molécula de CAR.
12. La mezcla de reacción de la Reivindicación 11, en el que el inhibidor quinasa es un inhibidor BTK.
13. La mezcla de reacción de la Reivindicación 11 o 12, en el que una o más de las células efectoras inmunes expresa la molécula de CAR o comprende el ácido nucleico que codifica la molécula de CAR.
14. La mezcla de reacción de la Reivindicación 12, en el que el inhibidor de BTK se elige entre ibrutinib, GDC-0834, RN-486, CGI-560, CGI-1764, HM-71224, CC-292, ONO-4059, CNX-774, o LFM-A13.

15. La mezcla de reacción de cualquiera de las Reivindicación 11-14, que comprende además células cancerosas.
16. Una mezcla de reacción que comprende una población de células efectoras inmunes, y una molécula de CAR o un ácido nucleico que codifica una molécula de CAR, en donde las células efectoras inmunes comprenden ITK covalentemente inactivado.
17. La mezcla de reacción de la Reivindicación 16, que comprende además células cancerosas.
18. La mezcla de reacción de la Reivindicación 16, en el que las células cancerosas comprenden BTK covalentemente inactivado.
19. Una composición que comprende una célula (por ejemplo, una población de células) que expresa una molécula de CAR que se une CD19 (una "célula que expresa CAR19 ") y uno o más inhibidores de quinasa, en el que el inhibidor de la quinasa se elige entre un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (BTK), una quinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4), un inhibidor de mTOR, o una proteína quinasa activada por mitógeno por la interacción con un inhibidor de quinasa (MNK).
20. Un método para proporcionar inmunidad antitumoral en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de una célula (por ejemplo, una población de células) que expresa una molécula de CAR que se une a CD19 (una célula que expresa CAR19) , en combinación con uno o más inhibidores de la quinasa elegidos de un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (BTK), una quinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4), un inhibidor de mTOR, o una proteína quinasa activada por mitógeno por la interacción con un inhibidor de quinasa (MNK).
21. El método de la Reivindicación 20, en el que el inhibidor de la quinasa y la célula que expresa CAR19 se administran al mamífero como una primera línea de terapia.

22. El método de la Reivindicación 20 o 21, donde la célula que expresa CAR19 se administra al mamífero después de la administración del inhibidor de quinasa.
23. El método de la Reivindicación 22, en el que:
- (i) la célula que expresa CAR19 se administra después de la interrupción de la administración del inhibidor de quinasa; o
 - (ii) la administración del inhibidor de la quinasa se inicia antes de la administración de la célula que expresa CAR19, y la célula que expresa CAR19 se administra en combinación con la administración continuada del inhibidor de quinasa.
24. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 20-23, en el que el mamífero es, o se identifica como, un respondedor completo o parcial para el inhibidor de BTK (por ejemplo, ibrutinib), o un respondedor completo o parcial para la célula que expresa CAR19.
25. La composición o método de cualquiera de las Reivindicaciones 19-24, en el que el inhibidor de BTK se elige entre ibrutinib, GDC-0834, RN-486, CGI-560, CGI-1764, HM-71224, CC-292, ONO-4059, CNX-774, o LFM-A13.
26. La composición o método de cualquiera de las Reivindicaciones 19-24, en el que el inhibidor de CDK4 es seleccionado entre: palbociclib, aloisina A, flavopiridol, 2- (2-clorofenil) -5,7-dihidroxi-8-[(3S,4R)-3-hidroxi-1-metil-4-piperidinil]-4-cromenona; crizotinib (PF-02341066, P276-00, RAF265, indisulam, roscovitina, dinaciclib, BMS 387032, MLN8054, AG-024322, AT7519, AZD5438, BMS908662; o ribociclib.
27. La composición o método de cualquiera de las Reivindicaciones 19-24, en el que el inhibidor de mTOR es seleccionado entre: rapamicina, un análogo de la rapamicina tales como everolimus, temsirolimus, ridaforolimus, semapimod, AZD8055, PF04691502, SF1126, XL765, o OSI-027.

28. La composición o método de cualquiera de las Reivindicaciones 19-24, en el que el inhibidor de MNK es seleccionado entre: CGP052088, CGP57380, cercosporamida, ETC-1780445-2, o 4-amino-5-(4-fluoroanilino)pirazolo[3,4-d] pirimidina.

29. La composición o método de cualquiera de las Reivindicaciones 19-28, en el que el inhibidor de la quinasa es ibrutinib y el ibrutinib tiene una dosis de aproximadamente 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 420 mg, 440 mg, 460 mg, 480 mg, 500 mg, 520 mg, 540 mg, 560 mg, 580 mg, o 600 mg.

30. La composición o método de cualquiera de las Reivindicaciones 19-29 en el que la célula que expresa una molécula de CAR comprende un dominio de unión anti-CD19, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular que opcionalmente comprende un dominio coestimulador y un dominio primario de señalización.

31. La composición o método de la Reivindicación 30, en el que la molécula de CAR comprende un dominio de unión anti-CD19 comprende una cadena ligera de la región 1 determinante de complementariedad (LC CDR1), una cadena ligera de la región 2 determinante de complementariedad (LC CDR2), una cadena ligera de la región 3 determinante de complementariedad (LC CDR3), una cadena pesada de la región 1 determinante de complementariedad (HC CDR1), una cadena pesada de la región 2 determinante de complementariedad (HC CDR2), y una cadena ligera de la región 3 determinante de complementariedad (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19.

32. La composición o método de la Reivindicación 30, en el que el dominio de unión anti-CD19 comprende una cadena ligera de la región variable murina de la Tabla 7, una cadena pesada de la región variable murina de la Tabla 7, o ambas.

33. La composición o método de la Reivindicación 30, en el que el dominio de unión anti-CD19 comprende una LC CDR1 de la SEQ ID NO: 5, una LC CDR2 de la SEQ ID NO: 26, y una LC CDR3 de SEQ ID NO: 27.

34. La composición o método de la Reivindicación 30, en el que el dominio de unión anti-CD19 comprende una HC CDR1 de la SEQ ID NO: 19, una LC CDR2 de cualquiera de las SEQ ID NOS: 20-23, y una HC CDR3 de la SEQ ID NO: 24.
35. La composición o método de la Reivindicación 30, en el que el dominio de unión anti-CD19 comprende una secuencia de SEQ ID NO: 59, o una secuencia con 95-99% de identidad con la misma.
36. La composición o método de la Reivindicación 30, en el que el dominio de unión anti-CD19 es un dominio de unión anti-CD19 humanizado.
37. La composición o método de la Reivindicación 30, en el que el dominio de unión a anti-CD19 humanizado comprende una secuencia seleccionada entre: la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, o una secuencia con 95-99% de identidad con las mismas.
38. La composición o método de la Reivindicación 30, en el que el dominio de unión anti-CD19 humanizado es un scFv que comprende una región variable de cadena ligera unida a una variable de cadena pesada a través de un enlazador, por ejemplo, en el que el enlazador comprende una secuencia de SEQ ID NO: 53.
39. La composición o método de la Reivindicación 19-38, en el que la molécula de CAR comprende un dominio transmembrana de una proteína elegida entre: la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, epsilon CD3, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 o CD154.
40. La composición o método de la Reivindicación 39, en el que el dominio transmembrana comprende una secuencia de SEQ ID NO: 15.

41. La composición o método de la Reivindicación 30, en el que el dominio de unión anti-CD19 está conectado al dominio transmembrana por una región bisagra, por ejemplo, en donde la región bisagra comprende una secuencia de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 45.
42. La composición o método de la Reivindicación 19-41, en el que la molécula de CAR comprende un dominio coestimulador, por ejemplo, en donde el dominio coestimulador comprende un dominio de señalización funcional de una proteína elegida entre: OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM -1, LFA-1 (CD11a/CD18) o 4-1BB (CD137), por ejemplo, en donde el dominio coestimulador comprende una secuencia de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 51.
43. La composición o método de la Reivindicación 19-42, en el que la molécula de CAR comprende un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, en el que el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional de 4-1BB, un dominio de señalización funcional de CD3 zeta, o ambos o en el que el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de CD27, un dominio de señalización funcional de CD3 zeta, o ambos.
44. La composición o método de la Reivindicación 43, en el que el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de SEQ ID NO: 16, una secuencia de SEQ ID NO: 17, o ambos; en el que el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de SEQ ID NO: 16, una secuencia de SEQ ID NO: 43, o ambos; en el que el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de SEQ ID NO: 51, una secuencia de SEQ ID NO: 17, o ambos; o en el que el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de SEQ ID NO: 51, una secuencia de SEQ ID NO: 43, o ambos.
45. La composición o método de la Reivindicación 19-44, en el que la molécula de CAR comprende además una secuencia líder, por ejemplo, en donde la secuencia líder comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

46. La composición o método de la Reivindicación 19-45, en el que la molécula CAR comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, o SEQ ID NO: 42.
47. La composición o método de la Reivindicación 19-46, en el que la composición comprende además, o el método comprende además la administración de un agente que inhibe una molécula inmune inhibidora elegido entre: PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, 3-CEACAM y / o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 o TGFR beta.
48. La composición o método de la Reivindicación 19-47, donde la composición comprende de $1-5 \times 10^8$ células que expresan CAR.
49. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 20-40, en el que el mamífero tiene una enfermedad asociada con la expresión de CD19.
50. El método de la Reivindicación 49, en el que la enfermedad asociada con la expresión de CD19 es un cáncer.
51. El método de la Reivindicación 50, en el que la enfermedad asociada con la expresión de CD19 es un cáncer hematológico, por ejemplo, un cáncer hematológico elegido entre una leucemia o un linfoma.
52. El método de la Reivindicación 50, en donde el cáncer se selecciona de entre: leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma de células del manto (MCL), mieloma múltiple, leucemia linfocítica aguda (ALL), linfoma de Hodgkin, leucemia linfocítica aguda de células B (BALL), leucemia linfocítica aguda de células T (TALL), leucemia linfocítica pequeña (SLL), B leucemia prolinfocítica celular, neoplasia blástica plasmacitoide de células dendríticas, el linfoma de Burkitt, linfoma difuso de células B (DLBCL), DLBCL asociado con inflamación crónica, linfoma folicular, linfoma folicular pediátrico, leucemia

de células peludas, linfoma de célula pequeñas o de células foliculares, procesos linfoproliferativos malignos, linfomas MALT (linfoma de la zona marginal extranodal del tejido linfoide asociado a la mucosa), linfoma de la zona marginal, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no de Hodgkin, linfoma plasmablastico, neoplasia plasmacitoide de células dendríticas, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma esplénico de la zona marginal, linfoma/leucemia esplénico, linfoma difuso de células B esplénicas pequeñas de pulpa roja, leucemia de células pilosas-variante, linfoma linfoplasmaítico, enfermedad de la cadena pesada, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma óseo solitario, plasmocitoma extraóseo, linfoma nodal de la zona marginal, nodal linfoma de la zona marginal pediátrica, linfoma primario del centro de folículo cutáneo, granulomatosis linfomatoide, linfoma mediastínico primario (tímico) de células B grandes, linfoma intravascular de células B, ALK + linfoma de células B, linfoma de células B que surge en una enfermedad asociada al HHV8 multicéntrico de Castleman, linfoma primario de cavidades, linfoma de células B, o linfoma clasificable.

53. El método de la Reivindicación 50, en donde el cáncer se selecciona de entre MCL, CLL, ALL, linfoma de Hodgkin, o mieloma múltiple.

54. La composición o método de cualquiera de las Reivindicaciones 19-53, en el que la composición comprende además, o el método comprende además la administración de una citoquina.

55. La composición o método de la Reivindicación 54, en el que la citocina es IL-7, IL-15, o IL-21.

56. La composición o método de cualquiera de las Reivindicaciones 19-55, en el que la CAR es una CAR regulable (RCAR).

57. La composición o método de la Reivindicación 56, en el que la RCAR comprende: un miembro de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización intracelular y un primer dominio de conmutación,

un miembro de unión a antígeno que comprende dominio de unión a antígeno que se une a CD19 y un segundo dominio interruptor; y
un dominio transmembrana.

58. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 20-57, en el que el mamífero tiene, o se identifica por tener, una mutación BTK.

59. El método de la Reivindicación 49, en el que la enfermedad asociada con la expresión de CD19 es un cáncer hematológico, y en el que la resistencia al inhibidor de quinasa, a la célula que expresa una molécula de CAR en el mamífero, o ambos, se retrasa o disminuye.

60. El método de la Reivindicación 49, en el que la enfermedad asociada con la expresión de CD19 es un cáncer hematológico, y en el que la remisión del cáncer hematológico se prolonga o la recaída del cáncer hematológico se retrasa.

61. La composición o método de cualquiera de las Reivindicaciones 19-60, en donde la composición además comprende, o el método además comprende administrar un segundo inhibidor de quinasa, en el que el segundo inhibidor de quinasa es distinto de ibrutinib.

62. La composición o método de la Reivindicación 61, en el que segundo inhibidor de la quinasa se elige entre uno o más de GDC-0834, RN-486, CGI-560, CGI-1764, HM-71224, CC-292, ONO-4059, CNX -774, o LFM-A13, o una combinación de los mismos.

63. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 20-62, en el que el mamífero es (o se identifica como) un respondedor parcial al inhibidor de quinasa, y se administra al mamífero la célula que expresa CAR19, sola o en combinación con el inhibidor de BTK, durante el período de respuesta parcial.

64. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 20-63, en el que el mamífero es (o se ha identificado como) un no respondedor que tiene una enfermedad progresiva o estable

después del tratamiento con ibrutinib, y se administra al mamífero la célula que expresan CAR19, sola o en combinación con un segundo inhibidor de BTK, durante el período de progresivo o estable de la enfermedad, en el que el segundo inhibidor de quinasa es distinto de ibrutinib.

65. La composición o método de cualquiera de las Reivindicaciones 19-64, en el que el inhibidor de la quinasa es ibrutinib y el ibrutinib se formula para administración de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos, por ejemplo, en el que la duración del ciclo es de 21 o 28 días.

66. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 20-65, que comprende llevar a cabo una infusión de linfocitos con al menos una célula que expresa CD19-CAR.

67. La composición o método de cualquiera de las Reivindicaciones 19-66, en donde la célula y el inhibidor de quinasa se formulan para la administración simultánea.

68. La composición o método de cualquiera de las Reivindicaciones 19-66, en el que la célula y el inhibidor de quinasa se formulan para la entrega secuencial.

69. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 20-68, en el que el mamífero ha sufrido linfodepleción.

70. El uso o método de la Reivindicación 69, en el que la linfodepleción comprende la administración de uno o más entre melfalán, citoxano, ciclofosfamida y fludarabina.

71. La composición o método de cualquiera de las Reivindicaciones 19-70, en el que la composición además comprende, o el método además comprende administrar una dosis baja potenciadora inmune, de un inhibidor de mTOR al mamífero.

72. La composición o método de la Reivindicación 71, en el que el inhibidor de mTOR es rapamicina o everolimus.

73. La composición o método de cualquiera de las Reivindicación 19-72, donde la célula que expresa CAR19 y los uno o más inhibidores de la quinasa están presentes en una forma de dosis única, o como dos o más formas de dosis.

74. La composición o método de cualquiera de las Reivindicaciones 19-73, en donde la célula que expresa CAR19 es una célula efectora inmune humana (por ejemplo, una célula T humana o una célula humana NK) o una población de células.

75. Un método de ingeniería de una célula efectora inmune (por ejemplo, una célula T) para expresar una CAR, que comprende:

Poner en contacto la célula efectora inmune ex vivo con una cantidad de un inhibidor mTOR que aumenta el número de células efectoras inmunitarias PD1 negativas (por ejemplo: células T) o aumenta la relación de células efectoras inmunitarias PD1 negativas (por ejemplo: células T) a inmunidad positiva PD1 células efectoras (por ejemplo: células T) y

Introducir (por ejemplo: transducir) un ácido nucleico que codifica una molécula CAR en la célula efectora inmune en condiciones tales que se expresa la molécula CAR.

76. El método de la Reivindicación 75, en el que el inhibidor mTOR es un inhibidor alosterico (por ejemplo: RAD001) o un inhibidor catalítico.

77. Un método para proporcionar inmunidad antitumoral en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de una población de células que expresan una molécula CAR que se une a CD19 y citoquina, por ejemplo IL-7, IL-15 y/o IL-21.
