

RECEPTORES QUIMERICOS DE ANTÍGENO ANTI-CLDN Y MÉTODOS DE USO

REFERENCIAS A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Nro. PCT/US2014/064165 conforme al Tratado de Cooperación de Patentes (PCT), presentada el 5 de noviembre de 2014, la Solicitud Provisional de EE.UU. Nro. 62/157.928, presentada el 6 de mayo de 2015, y la Solicitud Provisional de EE.UU. Nro. 62/247.108, presentada el 27 de octubre de 2015, cada una de las cuales se incorpora a la presente por referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

Esta solicitud contiene un listado de secuencias que ha sido presentado en formato ASCII a través de EFS-Web, el cual se incorpora a la presente por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 3 de noviembre de 2015, se titula `sc2703pct_S69697_1270WO_SEQL_110315.txt` y tiene un tamaño de 247.510 bytes.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención en general se refiere a una inmunoterapia adoptiva que comprende el uso de nuevos receptores quiméricos de antígeno que incorporan un dominio de unión a claudina (CLDN). En formas de realización preferidas, los receptores quiméricos de antígeno divulgados son útiles para el tratamiento o la profilaxis de trastornos proliferativos y cualquier recurrencia o metástasis de ellos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La diferenciación y proliferación de células madre y células progenitoras son procesos continuos normales que actúan en forma concertada para respaldar el desarrollo de tejidos durante la organogénesis, la reparación celular y el reemplazo celular. El sistema está estrechamente regulado para asegurar que sólo se generen las señales apropiadas sobre la base de las

necesidades del organismo. La proliferación y diferenciación celular normalmente se producen sólo según sea necesario para el reemplazo de células dañadas o moribundas, o para el crecimiento. Sin embargo, la alteración de estos procesos puede ser desencadenada por muchos factores, que incluyen la carencia o sobreabundancia de diversos químicos de señalización, la presencia de microentornos alterados, mutaciones genéticas o una combinación de ellos. La alteración de la proliferación y/o diferenciación celular normal puede conducir a diversos trastornos, que incluyen enfermedades proliferativas tales como el cáncer.

Los tratamientos terapéuticos convencionales para el cáncer incluyen quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia. A menudo, estos tratamientos son ineficaces, y la resección quirúrgica puede no brindar una alternativa clínica viable. Las limitaciones en el actual estándar de atención son particularmente evidentes en aquellos casos en los cuales los pacientes se someten a tratamientos de primera línea y posteriormente sufren una recaída. En tales casos, frecuentemente surgen tumores refractarios, a menudo agresivos e incurables. Las tasas de supervivencia general para muchos tumores sólidos han permanecido sin mayores cambios en los últimos años debido, al menos en parte, al fracaso de las terapias existentes para prevenir las recaídas, la recurrencia del tumor y la metástasis. Por lo tanto, sigue habiendo gran necesidad de desarrollar terapias más dirigidas y potentes para los trastornos proliferativos. La presente invención trata esta necesidad.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

En un aspecto amplio, la presente invención proporciona nuevos receptores quiméricos de antígeno (CAR) que comprenden un dominio de unión a CLDN que se une específicamente con al menos una proteína de la familia CLDN (CAR de CLDN). En formas de realización seleccionadas, los CAR de CLDN de la invención se unen específicamente con CLDN6 o específicamente con

CLDN6 y CLDN9. En incluso otras formas de realización, los anticuerpos de la invención se unen con CLDN6 y CLDN9 con sustancialmente la misma afinidad de unión aparente. En otras formas de realización, los CAR divulgados pueden reaccionar en forma cruzada con CLDN4. Incluso en otras formas de realización preferidas, las proteínas blanco de CLDN se expresan en células iniciadoras de tumores.

A través de la modificación genética (por ejemplo, transducción), los CAR de CLDN se expresan en linfocitos citotóxicos (preferentemente, autólogos) para proporcionar linfocitos sensibles a CLDN que se usan para apuntar contra células tumorales CLDN positivas y destruirlas. Como se analizará extensamente en la presente, los CAR de la presente invención generalmente comprenden un dominio extracelular que comprende un dominio de unión a CLDN, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que activa ciertos linfocitos y genera una respuesta inmune dirigida contra células tumorales CLDN positivas (es decir, aquellas que son CLDN6+ y/o CLDN9+ y/o CLDN4+). Las formas de realización seleccionadas de la invención comprenden células huésped inmunoactivas que expresan los CAR divulgados y diversas secuencias de polinucleótidos y vectores que codifican los CAR de CLDN de la invención. Incluso otros aspectos incluyen métodos para mejorar la actividad celular de linfocitos T o células asesinas naturales (NK) en un individuo y tratar a un individuo que sufre de cáncer al introducir en el individuo células huésped que expresan moléculas CAR de CLDN. Tales aspectos incluyen específicamente el tratamiento del cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas), melanoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, carcinoma de células renales, cáncer de ovario, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, leucemia y linfoma.

Como se analizará en mayor detalle a continuación, el término “anticuerpo”, según se usa en la presente, significa anticuerpos intactos (por ejemplo, IgG o IgM), así como cualquier fragmento inmunorreactivo (por ejemplo, fragmentos

Fab) o constructos inmunorreactivos o derivados de ellos (por ejemplo, scFv). En ciertas formas de realización, los dominios de unión a CLDN (y CAR de CLDN) de la presente invención comprenden constructos scFv y, en formas de realización preferidas, comprenden constructos scFv que compiten por la unión con anticuerpos que comprenden regiones variables de cadena pesada y liviana tal como se divulga en la presente. En otras formas de realización preferidas, los dominios de unión a CLDN (y CAR de CLDN) de la invención comprenden constructos scFv que comprenden regiones variables de cadena pesada y liviana divulgados en la presente o fragmentos de ellos. Como tales, a los fines de la presente divulgación, el término “anticuerpo” se usará en forma general e incluirá expresamente fragmentos inmunorreactivos, constructos o derivados de ellos, a menos que el contexto dicte lo contrario.

En aspectos particulares de la invención, el dominio de unión a CAR se une con al menos un miembro de la familia CLDN (por ejemplo, CLDN4, CLDN6 y/o CLDN9) y se deriva de, comprende o compite por la unión con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende: una región variable de cadena liviana (VL) de SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 23; o una VL de SEQ ID NO: 25 y una VH de SEQ ID NO: 27; o una VL de SEQ ID NO: 29 y una VH de SEQ ID NO: 31; o una VL de SEQ ID NO: 33 y una VH de SEQ ID NO: 35; o una VL de SEQ ID NO: 37 y una VH de SEQ ID NO: 39; o una VL de SEQ ID NO: 41 y una VH de SEQ ID NO: 43; o una VL de SEQ ID NO: 45 y una VH de SEQ ID NO: 47; o una VL de SEQ ID NO: 49 y una VH de SEQ ID NO: 51; o una VL de SEQ ID NO: 53 y una VH de SEQ ID NO: 55; o una VL de SEQ ID NO: 57 y una VH de SEQ ID NO: 59. En formas de realización particularmente preferidas, el dominio de unión a CLDN comprende un constructo scFv que comprende las secuencias VL y VH antes mencionadas, o fragmentos de ellas. En algunos aspectos de la invención, el dominio de unión a CAR comprende un anticuerpo quimérico, injertado con CDR, humanizado o humano, o un fragmento inmunorreactivo de éstos. En

otros aspectos de la invención, el dominio de unión a CAR que comprende las secuencias antes mencionadas es un anticuerpo internalizante.

En incluso otras formas de realización, el dominio de unión a CAR se une específicamente con CLND6; o se une específicamente con CLDN6 y CLDN9 y compite por la unión con un anticuerpo que comprende: una región variable de cadena liviana (VL) de SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 23; o una VL de SEQ ID NO: 25 y una VH de SEQ ID NO: 27; o una VL de SEQ ID NO: 29 y una VH de SEQ ID NO: 31; o una VL de SEQ ID NO: 33 y una VH de SEQ ID NO: 35; o una VL de SEQ ID NO: 37 y una VH de SEQ ID NO: 39; o una VL de SEQ ID NO: 41 y una VH de SEQ ID NO: 43; o una VL de SEQ ID NO: 45 y una VH de SEQ ID NO: 47; o una VL de SEQ ID NO: 49 y una VH de SEQ ID NO: 51; o una VL de SEQ ID NO: 53 y una VH de SEQ ID NO: 55; o una VL de SEQ ID NO: 57 y una VH de SEQ ID NO: 59.

Incluso otros CAR preferidos de la presente invención comprenden dominios de unión a CAR injertados con CDR o humanizados que comprenden una o varias CDR de cadena pesada (CDRH1, CDRH2, CDRH3) o liviana (CDRL1, CDRL2, CDRL3) como se establece en las FIGS. 3A o 3B, en donde las CDR se derivan según Kabat *et al.*

En una forma de realización particular, la invención comprende un dominio de unión que se une con al menos una proteína de la familia CLDN y compite por la unión con un anticuerpo que comprende tres CDR variables de cadena liviana (CDRL) como se establece en SEQ ID NO: 61; y tres CDR variables de cadena pesada (CDRH) como se establece en SEQ ID NO: 63; o tres CDRL como se establece en SEQ ID NO: 65 y tres CDRH como se establece en SEQ ID NO: 67; o tres CDRL como se establece en SEQ ID NO: 69 y tres CDRH como se establece en SEQ ID NO: 71; tres CDRL como se establece en SEQ ID NO: 73 y tres CDRH como se establece en SEQ ID NO: 87.

En una forma de realización adicional, la invención comprende un dominio de unión humanizado o injertado con CDR que se une con al menos una proteína

de la familia CLDN y compite por la unión con un anticuerpo que comprende una VH y VL, en donde la VL tiene tres CDRL que comprenden una CDRL1 de SEQ ID NO: 151, una CDRL2 de SEQ ID NO: 152 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 153; o una VL que tiene tres CDRL que comprenden una CDRL1 de SEQ ID NO: 157, una CDRL2 de SEQ ID NO: 158 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 159; o una VL que tiene tres CDRL que comprenden una CDRL1 de SEQ ID NO: 163, una CDRL2 de SEQ ID NO: 164 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 165; o una VL que tiene tres CDRL que comprenden una CDRL1 de SEQ ID NO: 169, una CDRL2 de SEQ ID NO: 170 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 171.

En una forma de realización adicional, la invención comprende un dominio de unión humanizado o injertado con CDR que se une con al menos una proteína de la familia CLDN y compite por la unión con un anticuerpo que comprende una VL y una VH, en donde la VH tiene tres CDR (CDRH) que comprenden una CDRH1 de SEQ ID NO: 154, una CDRH2 de SEQ ID NO: 155 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 156; o la VH tiene tres CDRH que comprenden una CDRH1 de SEQ ID NO: 160, una CDRH2 de SEQ ID NO: 161 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 162; o la VH tiene tres CDRH que comprenden una CDRH1 de SEQ ID NO: 166, una CDRH2 de SEQ ID NO: 167 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 168; o la VH tiene tres CDRH que comprenden una CDRH1 de SEQ ID NO: 172, una CDRH2 de SEQ ID NO: 173 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 174; o la VH tiene tres CDRH que comprenden una CDRH1 de SEQ ID NO: 172, una CDRH2 de SEQ ID NO: 176 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 174.

En una forma de realización adicional, la invención comprende un dominio de unión humanizado o injertado con CDR que se une con al menos una proteína de la familia CLDN y compite por la unión con un anticuerpo que comprende una VL y VH en donde la VL tiene tres CDRL que comprenden una CDRL1 de SEQ ID NO: 151, una CDRL2 de SEQ ID NO: 152 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 153 y la VH tiene tres CDRH que comprenden una CDRH1 de SEQ ID NO: 154, una CDRH2 de SEQ ID NO: 155 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 156; o un

anticuerpo que comprende una VL y VH en donde la VL tiene tres CDRL que comprenden una CDRL1 de SEQ ID NO: 157, una CDRL2 de SEQ ID NO: 158 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 159 y la VH tiene tres CDRH que comprenden una CDRH1 de SEQ ID NO: 160, una CDRH2 de SEQ ID NO: 161 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 162; o un anticuerpo que comprende una VL y VH en donde la VL tiene tres CDRL que comprenden una CDRL1 de SEQ ID NO: 163, una CDRL2 de SEQ ID NO: 164 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 165 y la VH tiene tres CDRH que comprenden una CDRH1 de SEQ ID NO: 166, una CDRH2 de SEQ ID NO: 167 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 168; o un anticuerpo que comprende una VL y VH en donde la VL tiene tres CDRL que comprenden una CDRL1 de SEQ ID NO: 169, una CDRL2 de SEQ ID NO: 170 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 171 y la VH tiene tres CDRH que comprenden una CDRH1 de SEQ ID NO: 172, una CDRH2 de SEQ ID NO: 173 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 174; o un anticuerpo que comprende una VL y VH en donde la VL tiene tres CDRL que comprenden una CDRL1 de SEQ ID NO: 169, una CDRL2 de SEQ ID NO: 170 y una CDRL3 de SEQ ID NO: 171 y la VH tiene tres CDRH que comprenden una CDRH1 de SEQ ID NO: 172, una CDRH2 de SEQ ID NO: 176 y una CDRH3 de SEQ ID NO: 174.

En formas de realización particularmente preferidas, el dominio de unión a CAR compite con un anticuerpo que comprende una VL de SEQ ID NO: 69 y una VH de SEQ ID NO: 71. En otras formas de realización, el constructo CAR comprende un dominio de unión que comprende una VL de SEQ ID NO: 69 y una VH de SEQ ID NO: 71. Preferentemente, el dominio de unión comprende una scFv.

En otras formas de realización particularmente preferidas, el dominio de unión a CAR compite con un anticuerpo que comprende una VL de SEQ ID NO: 73 y una VH de SEQ ID NO: 87. En otras formas de realización, el constructo CAR comprende un dominio de unión que comprende una VL de SEQ ID NO: 73 y una VH de SEQ ID NO: 87. Preferentemente, el dominio de unión comprende

una scFv. En ciertas formas de realización preferidas, cada uno de los mencionados receptores quiméricos de antígeno comprende un dominio de unión humanizado o injertado con CDR.

El término “compite” o “anticuerpo que compite”, cuando se usa en el contexto de los dominios de unión divulgados, significa la competencia de unión entre anticuerpos, según se determina mediante un ensayo en el cual un anticuerpo de referencia o fragmento inmunológicamente funcional sustancialmente previene o inhibe (por ejemplo, en más del 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o 90%) la unión específica de un anticuerpo de ensayo con un antígeno común. Los métodos compatibles para determinar dicha competencia comprenden técnicas conocidas en el arte, tales como, por ejemplo, interferometría bio-capa, resonancia de plasmón en superficie, citometría de flujo, ELISA competitivo, etc.

En ciertas formas de realización, la invención se dirige a un ácido nucleico que codifica un CAR que comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada o liviana de cualquiera de los dominios de unión anti-CLDN divulgados en la presente. En tal sentido, las secuencias de ácido nucleico que codifican dichas regiones variables de cadena pesada y liviana humanizadas o injertadas con CDR ilustrativas se presentan en la FIG. 3C y el listado de secuencias adjuntos. En formas de realización preferidas, el ácido nucleico que codifica el dominio de unión o CAR se incorpora en un plásmido o vector. En incluso otras formas de realización, el vector comprende un vector viral.

En otras formas de realización, la presente invención proporciona métodos para tratar el cáncer, tal como cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas, y cáncer gástrico, que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende una célula huésped que expresa un CAR anti-CLDN, tal como se divulga en la presente.

En algunas formas de realización, la invención proporciona métodos para tratar

el cáncer, que comprenden administrar una composición farmacéutica que comprende una célula huésped que expresa un CAR anti-CLDN, tal como se divulga en la presente, y que además comprende administrar al sujeto al menos un resto terapéutico adicional. En formas de realización preferidas, la célula huésped comprende un linfocito sensibilizado.

La presente invención también proporciona un método para reducir las células iniciadoras de tumores en una población de células tumorales, en donde el método comprende poner en contacto una población de células tumorales que comprende células iniciadoras de tumores y células tumorales distintas de células iniciadoras de tumores, con una célula huésped que expresa un CAR anti-CLDN; con lo cual la frecuencia de células iniciadoras de tumores se reduce.

En incluso otras formas de realización preferidas, la presente invención también proporciona kits o dispositivos y métodos asociados que son útiles en el tratamiento de trastornos asociados con CLDN, tales como el cáncer. Con este fin, la presente invención preferentemente proporciona un artículo de manufactura útil para generar linfocitos sensibles a CLDN para tratar trastornos asociados con CLDN que comprenden, por ejemplo, un receptáculo que contiene vectores (por ejemplo, vectores virales) que codifican los CAR divulgados y materiales instructivos para generar linfocitos sensibles a CLDN. En formas de realización seleccionadas, los kits comprenden reactivos y receptáculos adicionales para transducir los linfocitos en forma efectiva. En ciertas formas de realización seleccionadas, los kits se usan para transducir linfocitos autólogos obtenidos del paciente a tratar. En otras formas de realización seleccionadas, dichos kits comprenden linfocitos sensibles a CLDN alogénicos que se pueden administrar directamente al paciente para generar la respuesta inmune deseada.

La anterior es una síntesis y, por ende, contiene necesariamente simplificaciones, generalizaciones y omisiones de detalles; en consecuencia, el

especialista en el arte apreciará que la síntesis es únicamente ilustrativa y no tiene por fin limitar la invención en forma alguna. Otros aspectos, características y ventajas de los métodos, composiciones y/o dispositivos y/u otros objetos descritos en la presente se harán evidentes en las enseñanzas aquí presentadas. La síntesis se proporciona para introducir una selección de conceptos en forma simplificada, los cuales se describirán en mayor detalle a continuación en la Descripción Detallada. Dicha síntesis no tiene por fin identificar características clave o características esenciales del objeto reivindicado, ni tiene por fin ser usada como ayuda para determinar el alcance del objeto reivindicado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 muestra los niveles de expresión de ARNm relativos de CDLN4, CLDN6 y CLDN9 determinados por secuenciación de transcriptoma entero (SOLiD) en tumores de xenoinjerto derivado de pacientes (PDX) seleccionados, en donde los tipos tumorales se denotan de acuerdo con las abreviaturas enumeradas en la Tabla 3 a continuación;

Las FIGS. 2A – 2C ilustran la relación entre los miembros de la familia CLDN, en donde la FIG. 2A es un dendrograma que muestra el grado relativo de similitud entre las 30 proteínas CLDN codificadas por los 23 genes CLDN humanos, la FIG. 2B es una representación tabular del porcentaje de identidad de los residuos de aminoácidos en el dominio extracelular (ECD) 1 o ECD2 en CLDN4, CLDN6 y CLDN9, y la FIG. 2C es una representación tabular del porcentaje de identidad de residuos de aminoácidos en los bucles ECD1 y ECD2 entre las 16 proteínas que comprenden la serie de ortólogos de humano, rata, ratón y mono cynomolgus de CLDN4, CLDN6 y CLDN9;

Las FIGS. 3A – 3C proporcionan, en forma tabular, secuencias de aminoácidos de región variable contiguas de cadena liviana (FIG. 3A) y cadena pesada (FIG. 3B) de anticuerpos anti-CLDN de ratón y humanizados ilustrativos (SEQ ID NOS: 21–75, números impares) y variantes de hSC27.22,

hSC27.108 y hSC27.204, mientras que la FIG. 3C muestra las secuencias de ácido nucleico de las mismas regiones variables de cadena liviana y cadena pesada de dichos anticuerpos anti-CLDN de ratón y humanizados ilustrativos (SEQ ID NOS: 20–74, números pares) junto con las variantes de los anticuerpos hSC27.22, hSC27.108 y hSC27.204;

Las FIGS. 4A – 4C demuestran la reactividad cruzada de ciertos dominios de unión de la invención, donde la FIG. 4A muestra la capacidad de los dominios de unión anti-CLDN SC27.1 y SC27.22 para unirse con células HEK–293T que sobreexpresan CLDN4, CLDN6 y CLDN9 humanos, la FIG. 4B muestra la capacidad de los anticuerpos anti-CLDN para unirse con células HEK–293T que sobreexpresan CLDN4, CLDN6 y CLDN9, y la FIG. 4C ilustra gráficamente la afinidad de unión aparente de un anticuerpo anti-CLDN ilustrativo por CLDN6 y CLDN9, según se determina por titulación de la cantidad de anticuerpo versus un número fijo de células que expresan el antígeno de interés;

La FIG. 5 proporciona una representación esquemática de un constructo CAR de CLDN ilustrativo compatible con las enseñanzas de la presente;

Las FIGS. 6A – 6D muestran secuencias de ácidos nucleicos (FIGS. 6A y 6C) y aminoácidos (FIGS. 6B y 6D) de dos nuevos receptores quiméricos de antígeno SCT1–SC27.108 y SCT1–SC27.204v2 de la presente invención;

La FIG. 7 proporciona una representación esquemática que ilustra un proceso para producir linfocitos sensibles a CLDN y su posterior uso para generar una respuesta inmune dirigida a células tumorales CLDN positivas;

Las FIGS. 8A y 8B demuestran la expresión de un CAR de CLDN ilustrativo en células Jurkat transducidas (FIG. 8A) y la expresión de hCLDN en células HEK–293T de control modificadas por ingeniería genética (FIG. 8B), cada una según se mide por citometría de flujo;

Las FIGS. 9A y 9B muestran las relaciones de células Jurkat CAR de CLDN a células de control que expresan CLDN usadas para medir la actividad de las

células CAR de CLDN ilustrativas (FIG. 9A) y la inducción de una respuesta inmune en células Jurkat transducidas SCT1-h27.108 o SCT1-h27.204v2 según se mide por producción de IL-2 (FIG. 9B);

La FIG. 10 demuestra que los linfocitos humanos de dos individuos se pueden modificar por ingeniería genética para expresar en forma efectiva anti-CAR de CLDN (SCT1-h27.108 o SCT1-h27.204v2) de acuerdo con las enseñanzas de la presente;

Las FIGS. 11A y 11B proporcionan perfiles de expresión en superficie de CLDN para una línea celular 293T modificada por ingeniería genética para expresar CLDN6 (FIG. 11A) y una línea celular de xenoinjerto derivado de paciente (PDX) de cáncer de ovario (FIG. 11B), según se evidencia por citometría de flujo;

Las FIGS. 12A y 12B demuestran la capacidad de linfocitos sensibles a CLDN que comprenden células huésped de dos individuos para provocar una respuesta inmune (según se mide por la inducción de INF γ) cuando se exponen a células 293T modificadas por ingeniería genética (FIG. 12A) o células tumorales PDX (FIG. 12B);

Las FIGS. 13A y 13B demuestran la capacidad de linfocitos sensibles a CLDN que comprenden células huésped de dos individuos para provocar una respuesta inmune (según se mide por la inducción de INF α) cuando se exponen a células 293T modificadas por ingeniería genética (FIG. 13A) o células tumorales PDX (FIG. 13B); y

Las FIGS. 14A y 14B muestran la capacidad de linfocitos sensibles a CLDN que comprenden células huésped de dos individuos para eliminar células 293T modificadas por ingeniería genética (FIG. 14A) o células tumorales PDX (FIG. 14B) tras la exposición.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se puede poner en práctica de muchas formas distintas. En la presente se divulgan formas de realización ilustrativas, no limitantes, de la

invención que ejemplifican sus principios. Todo título de sección usado en la presente es con fines organizativos únicamente y no se ha de interpretar como una limitación al objeto descrito. A los fines de la presente divulgación, todos los números de acceso secuencias de identificación se pueden encontrar en la base de datos de Secuencias de Referencia del NCBI (RefSeq) y/o la base de datos de secuencias de archivo GenBank® del NCBI, a menos que se indique lo contrario.

Los reciente avances en la inmunoterapia de transferencia adoptiva han brindado un prometedor enfoque para el tratamiento de diversas neoplasias y una chance para mejorar las experiencias de los pacientes, en particular con respecto a los tumores sólidos. En tal sentido, la presente invención se refiere al uso de nuevos receptores quiméricos de antígeno ("CAR") que comprenden un dominio de unión o blanco extracelular que se asocia o reacciona con al menos un miembro de la familia de claudina ("CLDN"). Preferentemente, los CAR se asocian en forma inmuno-específica con al menos uno de CLDN6, CLDN4 y/o CLDN9. Como se analizará extensamente en la presente, CLDN (por ejemplo, CLDN6) es un marcador tumoral particularmente efectivo que se expresa en varios tipos diferentes de cáncer y, significativamente, ha demostrado estar asociado con células madre cancerígenas. Por lo tanto, cuando los dominios de unión anti-CLDN de la presente invención se incorporan en un receptor quimérico de antígeno expresado en linfocitos, los "linfocitos sensibles a CLDN" resultantes (por ejemplo, células asesinas naturales o células T que reconocen inmuno-específicamente CLDN) son capaces de presentar en forma efectiva una respuesta inmune dirigida contra células CLDN positivas aberrantes, incluidas células madre cancerígenas. Esta capacidad para eliminar efectivamente las células "semilla" tumorigénicas suele ser crítica para reducir la posibilidad de recurrencia o metástasis tumoral. Con este fin, se apreciará que las células T CAR anti-CLDN de la presente invención se pueden usar en combinación con otros agentes terapéuticos

(incluidos conjugados anticuerpo anti-CLDN – fármaco) o como parte de un régimen de mantenimiento luego de tratamientos estándar.

Más generalmente, el receptor quimérico de antígeno es una proteína híbrida o polipéptido construido artificialmente que contiene o que comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo unido a un dominio de señalización (por ejemplo, dominios de señalización de células T o de activación de células T). Los CAR tienen la capacidad de redirigir dicha especificidad y reactividad de los linfocitos sensibilizados (por ejemplo, células T) hacia células blanco CLDN positivas de manera no restringida a MHC, explotando las propiedades de unión a antígeno de los anticuerpos monoclonales. El reconocimiento de antígenos no restringidos a MHC proporciona a las células T que expresan CAR la capacidad de reconocer un CLDN independiente del procesamiento de antígeno, con lo cual evade un importante mecanismo de escape tumoral. Más aún, cuando se expresan en células T, los CAR ventajosamente no dimerizan con cadenas alfa y beta del receptor de células T (TCR) endógeno, lo cual puede ocurrir cuando se aplican técnicas de ingeniería genética de TCR.

Por consiguiente, la presente invención se dirige en general a receptores quiméricos de antígeno que comprenden un dominio de unión a CLDN que se asocia inmuno-específicamente con CLDN en células blanco y estimula una respuesta inmune. En formas de realización preferidas, el dominio de unión a CLDN del CAR puede comprender un scFv derivado de las regiones variables de anticuerpo de cadena pesada y liviana divulgadas en la presente. Más específicamente, un “CAR anti-CLDN” o simplemente “CAR CLDN” de la presente invención comprende una proteína quimérica que incorpora un dominio de unión a CLDN extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular (véase la FIG. 5). Típicamente, una secuencia de nucleótidos que codifica el CAR CLDN deseado se sintetiza o modifica genéticamente y se inserta en un vector o sistema de expresión (por

ejemplo, lentiviral, retroviral, etc.). En formas de realización preferidas, los linfocitos, incluidos linfocitos T y células asesinas naturales ("células NK"), obtenidos de un paciente o donante se exponen luego (por ejemplo, se transducen) al vector de CAR CLDN seleccionado para proporcionar linfocitos genéticamente modificados que expresan la proteína CAR con el dominio de unión a CLDN extracelular (es decir, "linfocitos sensibles a CLDN"). En otras formas de realización, las células alogénicas se pueden modificar por ingeniería genética para expresar los CAR divulgados para proporcionar linfocitos sensibles a CLDN. Luego de la expansión opcional, estos linfocitos sensibles a CLDN se pueden infundir en un paciente para montar una respuesta inmuno-específica a células tumorales CLDN positivas (véase en general la FIG. 7). En tal sentido, los linfocitos sensibles a CLDN se activarán tras el contacto con una célula blanco que expresa un determinante CLDN. Activar los linfocitos sensibilizados (por ejemplo, células T y células NK) significa inducir un cambio en su estado biológico por el cual las células expresan marcadores de activación, producen citoquinas, proliferan y/o se tornan citotóxicas para las células blanco. Todos estos cambios pueden ser producidos por señales estimuladoras primarias, preferentemente junto con señales coestimuladoras que amplifican la magnitud de las señales primarias y suprimen la muerte celular luego de la estimulación inicial, lo cual da por resultado un estado de activación más duradero y así una mayor capacidad citotóxica.

Se podrá apreciar también que, además del dominio de unión a CLDN, los CAR de la invención comprenden un dominio intracelular o citoplásmico que inicia una secuencia de señalización citoplásmica primaria (por ejemplo, una secuencia para iniciar la activación primaria dependiente de antígeno a través de un complejo receptor de células T). Los dominios intracelulares compatibles pueden, por ejemplo, derivarse de CD3 ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En otras formas de realización

preferidas, los CAR de la invención comprenden un dominio intracelular que inicia una señal secundaria o coestimuladora. Los dominios coestimulatorios compatibles pueden comprender, por ejemplo, dominios intracelulares derivados de CD2, CD4, CD5, CD8 α , CD8 β , CD28, CD134, CD137, ICOS, CD154, 4-1BB y receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (véase U.S.P.N. US/2014/0242701). Además, en formas de realización preferidas, los CAR divulgados comprenden un dominio transmembrana (y opcionalmente un espaciador) interpuesto entre el dominio de unión a CLDN extracelular y el dominio de señalización intracelular. Como se analiza en mayor detalle a continuación, el dominio transmembrana puede comprender, por ejemplo, parte de una región constante de anticuerpo (Fc), CD8a humano o espaciadores producidos artificialmente conocidos en el arte. Esencialmente, cualquier secuencia de aminoácidos que ancle el CAR en la membrana celular y permita una asociación efectiva del dominio de unión a CLDN y la transmisión de la señalización apropiada desde el dominio intracelular es compatible con la invención.

Con respecto a los nuevos CAR de CLDN de la invención, se apreciará que la selección de CLDN como blanco tumoral es integral en la generación de una respuesta inmune efectiva. Más específicamente, se ha descubierto que los determinantes fenotípicos de CLDN están asociados clínicamente con diversos trastornos proliferativos, incluidos varios tipos de cáncer, y que las proteínas CLDN y las variantes o isoformas de ellas proporcionan marcadores tumorales útiles que se pueden explotar en el tratamiento de las enfermedades relacionadas. En tal sentido, la presente invención proporciona varios receptores quiméricos de antígeno que comprenden un dominio de unión anti-CLDN además de cualquier componente de señalización. Como se analiza en mayor detalle a continuación, los CAR de CLDN divulgados son particularmente efectivos para eliminar células tumorigénicas y, por lo tanto, son útiles para el tratamiento y la profilaxis de ciertos trastornos proliferativos o

la progresión o recurrencia de ellos.

Más aún, como se establece en la presente solicitud, se ha descubierto que los marcadores o determinantes de CLDN, tales como proteínas CLDN de superficie celular, están terapéuticamente asociados con células madre cancerígenas (también conocidas como células perpetuantes del tumor) y pueden ser efectivamente impulsados para eliminar o silenciar los mismos. La capacidad para reducir selectivamente o eliminar células madre cancerígenas a través del uso de CAR de CLDN, tal como se divulga en la presente, es sorprendente ya que dichas células son conocidas por ser generalmente resistentes a muchos tratamientos convencionales. Es decir, la efectividad de los métodos de tratamiento tradicionales, así como los métodos de tratamiento dirigidos más recientes, suele estar limitada por la existencia y/o emergencia de células madre cancerígenas resistentes que son capaces de perpetuar el crecimiento tumoral incluso en vista de diversos métodos de tratamiento. Más aún, los determinantes asociados con células madre cancerígenas a menudo son malos blancos terapéuticos debido a la baja o inconsistente expresión, al fracaso para permanecer asociados con la célula tumorigénica o al fracaso para estar presentes en la superficie celular. En agudo contraste con las enseñanzas del arte previo, los CAR de CLDN divulgados en la presente y los métodos asociados superan efectivamente esta resistencia inherente para específicamente eliminar, extinguir, silenciar o promover la diferenciación de dichas células madre cancerígenas, con lo cual se niega su capacidad para mantener o, significativamente, reinducir el crecimiento tumoral subyacente.

Por lo tanto, es particularmente destacable que CAR de CLDN tales como aquellos divulgados en la presente se puedan usar ventajosamente en el tratamiento y/o la prevención de trastornos proliferativos seleccionados (por ejemplo, neoplásicos), o la progresión o recurrencia de ellos. Se apreciará que, aunque las formas de realización preferidas de la invención se analizarán extensamente a continuación, en particular en términos de dominios o regiones

de señalización o coestimuladoras ilustrativas, o en el contexto de células madre cancerígenas o tumores que comprenden características seleccionadas y sus interacciones con los CAR de CLDN divulgados, el especialista en el arte apreciará que el alcance de la presente invención no está limitado por dichas formas de realización ilustrativas. En cambio, las formas de realización más expansivas de la presente invención y las reivindicaciones adjuntas están dirigidas en forma amplia y expresa a cualquier receptor quimérico de antígeno que comprende un dominio de unión que se asocia o se une inmunoespecíficamente con al menos un miembro de la familia de claudina y su uso en el tratamiento y/o la prevención de una variedad de trastornos asociados o mediados por CLDN, incluidos trastornos proliferativos neoplásicos o celulares, independientemente de cualquier mecanismo de acción particular, constructo de CAR, o componente tumoral, celular o molecular específicamente apuntado. En formas de realización particularmente preferidas, los CAR de la presente invención se unen inmunoespecíficamente o se asocian con CLDN6.

A tal fin, y como se demuestra en la presente solicitud, se ha descubierto inesperadamente que los CAR de CLDN divulgados se pueden usar en forma efectiva para apuntar y eliminar, o de lo contrario incapacitar, células proliferativas o tumorigénicas, y tratar trastornos asociados con CLDN (por ejemplo, neoplasias). Según se usa en la presente, un "trastorno asociado con CLDN" significa cualquier trastorno o enfermedad (incluidos trastornos proliferativos) que sea marcado, diagnosticado, detectado o identificado por una aberración fenotípica de los componentes o la expresión genética de CLDN ("determinante de CLDN") durante el curso o la etiología de la enfermedad o trastorno. En tal sentido una aberración fenotípica o determinante de CLDN puede comprender, por ejemplo, niveles elevados o deprimidos de expresión de proteína CLDN (por ejemplo, CLDN6), expresión anormal de proteína CLDN en ciertas poblaciones celulares definibles o expresión anormal de proteína CLDN en una fase o estadio inapropiado del

ciclo de vida celular. Por supuesto, se apreciará que similares patrones de expresión de determinantes genotípicos (por ejemplo, niveles de transcripción de ARNm) de CLDN también pueden usarse para clasificar, detectar o tratar trastornos de CLDN.

I. Fisiología de claudina (CLDN)

Se ha descubierto que los determinantes fenotípicos de CLDN se asocian clínicamente con diversos trastornos proliferativos, incluidas neoplasias, y que las proteínas de la familia CLDN (incluyendo CLDN6), y sus variantes o isoformas, proporcionan útiles marcadores tumorales que se pueden explotar en el tratamiento de enfermedades relacionadas. En tal sentido, la presente invención proporciona un número de constructos de CAR CLDN que comprenden un agente de unión o dirección anti-CLDN genéticamente modificado que se asocia operativamente con uno o varios dominios de señalización capaces de inducir una respuesta inmune en un linfocito. Como se analiza en mayor detalle a continuación y se establece en los Ejemplos adjuntos, los CAR anti-CLDN divulgados son particularmente efectivos para eliminar células tumorigénicas y, por lo tanto, son útiles para el tratamiento y la profilaxis de ciertos trastornos proliferativos, o la progresión o recurrencia de ellos.

Más aún, se ha descubierto que los marcadores o determinantes de CLDN, tales como proteínas CLDN de superficie celular (por ejemplo, CLDN6), están terapéuticamente asociados con células madre cancerígenas (también conocidas como células perpetuantes del tumor) y pueden ser efectivamente explotados para eliminar o silenciar los mismos. La capacidad para reducir selectivamente o eliminar células madre cancerígenas a través del uso de CAR de CLDN, tal como se divulga en la presente, es sorprendente ya que dichas células son conocidas por ser generalmente resistentes a muchos tratamientos convencionales. Es decir, la efectividad de los métodos de tratamiento tradicionales, así como los métodos de tratamiento dirigidos más recientes,

suele estar limitada por la existencia y/o emergencia de células madre cancerígenas resistentes que son capaces de perpetuar el crecimiento tumoral incluso en vista de estos diversos métodos de tratamiento. Más aún, los determinantes asociados con células madre cancerígenas a menudo son malos blancos terapéuticos debido a la baja o inconsistente expresión, al fracaso para permanecer asociados con la célula tumorigénica o al fracaso para estar presentes en la superficie celular. En agudo contraste con las enseñanzas del arte previo, los CAR y los métodos divulgados en la presente superan efectivamente esta resistencia inherente para específicamente eliminar, extinguir, silenciar o promover la diferenciación de dichas células madre cancerígenas, con lo cual se niega su capacidad para mantener o reinducir el crecimiento tumoral subyacente.

Las claudinas son proteínas de membrana integrales que comprenden una proteína estructural mayor de uniones estrechas, la unión de adhesión célula-célula más apical en tipos celulares polarizados tales como aquellos hallados en láminas de células epiteliales o endoteliales. Las uniones estrechas están compuestas por hebras de proteínas en red que forman sellos continuos alrededor de las células para proporcionar una barrera física pero modulable al transporte de solutos y agua en el espacio paracelular. La familia claudina de proteínas en humanos está compuesta por al menos 23 miembros, con un tamaño que oscila entre 22 y 34 kDa. Todas las claudinas poseen una topología tetraspanina en la cual ambos términos de la proteína se ubican en la cara intracelular de la membrana, lo cual causa la formación de dos bucles extracelulares (EC): EC1 y EC2. Los bucles EC median interacciones cabeza a cabeza homofílicas y, para ciertas combinaciones de claudinas, heterofílicas que conducen a la formación de uniones estrechas. Las interacciones claudina-claudina específicas y las secuencias EC de claudina son un determinante clave de la selectividad iónica y la fortaleza de las uniones estrechas (por ejemplo, véase Nakano *et al.*, 2009, PMID: 19696885).

Típicamente, EC1 tiene un tamaño de aproximadamente 50–60 aminoácidos, contiene un enlace disulfuro conservado dentro de un motivo W–X(17–22)–W–X(2)–C–X(8–10)–C mayor, y numerosos residuos cargados que participan en la formación de canales iónicos (Turksen y Troy, 2004, PMID: 15159449). EC2 es menor que EC1, de aproximadamente 25 aminoácidos. Debido a su conformación hélice–vuelta–hélice, se ha sugerido que EC2 contribuye a la formación de dímeros o multímeros de claudinas en membranas celulares opuestas, aunque las mutaciones en ambos bucles pueden perturbar la formación de complejos. Los complejos claudina–claudina *in vitro* pueden variar en tamaño entre dímeros y hexámeros, dependiendo de las claudinas específicas involucradas (Krause *et al.*, 2008, PMID: 18036336). Las claudinas individuales muestran un rango de patrones de expresión específica del tejido, así como una expresión regulada por el desarrollo según se determina por análisis de PCR (Krause *et al.*, 2008, PMID:18036336; Turksen, 2011, PMID:21526417).

Se puede usar análisis de secuencias para construir árboles filogenéticos para los miembros de la familia claudina, indicando la relación y los grados de cercanía de las secuencias de proteínas (FIG. 2A). Por ejemplo, se puede observar que las proteínas CLDN6 y CLDN9 están estrechamente relacionadas, lo cual, dada la ubicación adyacente cabeza a cabeza de sus genes en la ubicación cromosómica 16p3.3, sugiere una duplicación génica ancestral. Estas similitudes se pueden traducir en una capacidad de estos miembros de la familia para interactuar heterotípicamente. De manera similar, las proteínas CLDN3 y CLDN4 están estrechamente relacionadas por análisis de secuencias, y sus genes se pueden hallar en tándem en la ubicación cromosómica 7r11.23. La elevada homología en los bucles EC1 o EC2 entre ciertos miembros de la familia (por ejemplo, FIG. 2B) proporciona una oportunidad para desarrollar anticuerpos que son multi–reactivos con distintos miembros de la familia claudina, mientras que la sustancial homología entre el

bucle ECD 1 y el bucle ECD 2 de diversas especies (FIG. 2C) permite el desarrollo de anticuerpos con reactividad cruzada que se unen con ortólogos seleccionados.

CLDN6, también conocida como eskulina, es una claudina regulada por desarrollo. Los ortólogos de proteína CLDN6 representativos incluyen, aunque no a modo de limitación, humano (NP_067018), chimpancé (XP_523276), mono rhesus (NP_001180762), ratón (NP_061247) y rata (NP_001095834). En los humanos, el gen *CLDN6* consiste en 2 exones que se extienden aproximadamente 3,5 kbp en la ubicación cromosómica 16p13.3. La transcripción del locus *CLDN6* proporciona un transcrito de ARNm maduro de 1,4 kB (NM_021195), que codifica una proteína de 219 aminoácidos (NP_061247). CLDN6 se expresa en derivados de células ES con un destino epitelial (Turksen y Troy, 2001, PMID: 11668606), en el peridermo (Morita *et al.*, 2002, PMID: 12060405) y en el nivel suprabasal de la epidermis (Turkson y Troy, 2002, PMID: 11923212). También se expresa en el riñón en desarrollo del ratón (Abuazza *et al.*, 2006, PMID: 16774906), aunque la expresión no se detecta en el riñón del adulto (Reyes *et al.*, 2002, PMID: 12110008). CLDN6 también es un correceptor para el virus de la hepatitis C, junto con CLDN1 y CLDN9 (Zheng *et al.*, 2007, PMID: 17804490).

CLDN9 es el miembro de la familia más estrechamente relacionado con CLDN6. Los ortólogos de proteína CLDN9 representativos incluyen, aunque no a modo de limitación, humano (NP_066192), chimpancé (XP_003314989), mono rhesus (NP_001180758), ratón (NP_064689) y rata (NP_001011889). En los humanos, el gen *CLDN9* consiste en un único exón que se extiende aproximadamente 2,1 kbp en el locus cromosómico 16p13.3. La transcripción del locus *CLDN9* sin intrón proporciona un transcrito de ARNm de 2,1 kB (NM_020982), que codifica una proteína de 217 aminoácidos (NP_0066192). CLDN9 se expresa en diversas estructuras del oído interno (Kitarjiri *et al.*, 2004, PMID:14698084; Nankano *et al.*, 2009, PMID: 19696885), la córnea (Ban *et al.*,

2003, PMID:12742348), el hígado (Zheng *et al.*, 2007, PMID:17804490) y el riñón en desarrollo (Abuazza *et al.*, 2006, PMID:16774906). Consistente con su expresión en la cóclea, los animales que expresan una proteína CLDN9 con una mutación de sentido erróneo muestran defectos en la audición, probablemente debido a una alterada permeabilidad paracelular de K⁺ con la consecuente perturbación de las corrientes iónicas críticas para la despolarización de las células pilosas involucradas en la detección del sonido. La expresión de CLDN9 en células del oído interno se localiza específicamente en un subdominio por debajo de las cadenas de unión estrecha más apicales formadas por otras claudinas, lo cual indica que no todas las claudinas en tejidos normales se hallan en las uniones estrechas más apicales y accesibles (Nankano *et al.*, 2009, PMID: 19696885). A diferencia de los resultados en la cóclea, los ratones que expresan CLDN9 de sentido errado no mostraron signos de defectos hepáticos o renales (Nankano *et al.*, 2009, PMID: 19696885).

CLDN4 también se conoce como el receptor de enterotoxina *Clostridium perfringens*, debido a la unión de alta afinidad con esta toxina, responsable de la intoxicación alimenticia y otras enfermedades gastrointestinales. Los ortólogos de proteína CLDN4 representativos incluyen, aunque no a modo de limitación, humano (NP_001296), chimpancé (XP_519142), mono rhesus (NP_001181493), ratón (NP_034033) y rata (NP_001012022). En los humanos, el gen *CLDN4* sin intrón se extiende aproximadamente 1,82 kbp en la ubicación cromosómica 17q11.23. La transcripción del locus *CLDN4* proporciona un transcrito de ARNm de 1,82 kB (NM_001305), que codifica una proteína de 209 aminoácidos (NP_001296). Consistente con la capacidad de CLDN4 de unirse con una toxina producida por un patógeno gastrointestinal, la expresión de CLDN4 se puede detectar en todo el tracto GI, así como en próstata, vejiga, mama y pulmón (Rahner *et al.*, 2001, PMID:11159882; Tamagawa *et al.*, 2003, PMID:12861044; Wang *et al.*, 2003, PMID:12600828;

Nichols *et al.*, 2004, PMID:14983936).

Aunque las claudinas son importantes en la función y la homeostasis de tejidos normales, las células tumorales frecuentemente exhiben una función de unión estrecha anormal. Esto puede estar ligado con la expresión desregulada y/o la localización de claudinas como consecuencia de la des-diferenciación de células tumorales, o el requisito de los tejidos cancerosos de rápido crecimiento de absorber eficientemente los nutrientes dentro de una masa tumoral con vascularización anormal (Morin, 2005, PMID: 16266975). Los miembros individuales de la familia claudina pueden estar sobreexpresados en ciertos tipos de cáncer, e incluso subexpresados en otros. Por ejemplo, la expresión de CLDN3 y CLDN4 es elevada en ciertos tipos de cáncer de páncreas, mama y ovario, e incluso puede ser menor en otros carcinomas de mama (por ejemplo, "bajas en claudina"). Las proteínas claudinas pueden ser blancos particularmente buenos para CAR, ya que se sabe que las claudinas sufren endocitosis, el tiempo de renovación de algunas claudinas es corto en relación con otras proteínas de membrana (Van Itallie *et al.*, 2004, PMID: 15366421), la expresión de claudinas está desregulada en células cancerígenas, y las estructuras de unión estrecha entre células tumorales están alteradas en las células cancerígenas. Estas propiedades pueden brindar más oportunidades para que los linfocitos activados se unan a proteínas claudinas en tejidos neoplásicos pero no en tejidos normales. Aunque los dominios de unión específicos de claudinas individuales pueden ser útiles, también es posible que los CAR de claudinas polirreactivas faciliten más la entrega de beneficios a una población más amplia de pacientes. Específicamente, los CAR de claudinas polirreactivas pueden permitir un direccionamiento más eficiente de células que expresan múltiples proteínas claudinas debido a una mayor densidad de antígenos agregados, reducir la probabilidad de escape de las células tumorales con bajos niveles de expresión de antígeno de cualquier claudina individual, y como puede verse en los ejemplos de expresión más abajo,

expandir el número de indicaciones terapéuticas para un único CAR CLDN.

II. Células madre cancerígenas

Como se mencionó antes, se ha descubierto sorprendentemente que la expresión aberrante de CLDN (genotípica y/o fenotípica) se asocia con diversas subpoblaciones de células tumorigénicas. En tal sentido, la presente invención proporciona regímenes terapéuticos mediados por CAR CLDN que pueden ser particularmente útiles para apuntar a dichas células (por ejemplo, células madre cancerígenas), con lo cual se facilita el tratamiento, el manejo o la prevención de trastornos neoplásicos. Por ende, en formas de realización preferidas, los CAR CLDN divulgados se pueden usar ventajosamente para reducir la frecuencia de las células iniciadoras de tumores de acuerdo con las presentes enseñanzas, y así facilitar el tratamiento o el manejo de trastornos proliferativos.

De acuerdo con los modelos actuales, un tumor comprende células no tumorigénicas y células tumorigénicas. Las células no tumorigénicas no tienen la capacidad de auto-renovarse y son incapaces de formar tumores reproduciblemente, incluso cuando son trasplantadas a ratones inmunocomprometidos en una cantidad excesiva de células. Las células tumorigénicas, también denominadas en la presente "células iniciadoras de tumores" (TIC), que constituyen hasta un 0,1–40% (más típicamente 0,1–10%) de una población de células tumorales, tienen la capacidad de formar tumores. Las células tumorigénicas abarcan tanto células perpetuantes del tumor (TPC), denominadas indistintamente células madre cancerígenas (CSC), como células progenitoras del tumor (TProg).

Las CSC, como las células madre normales que respaldan las jerarquías celulares en el tejido normal, son capaces de auto-replicarse indefinidamente mientras que mantienen la capacidad de diferenciación multilínea. Las CSC son capaces de generar progenie tanto tumorigénica como no tumorigénica, y son capaces de recapitular completamente la composición celular heterogénea

del tumor parental, como lo demuestra la aislación serial y el trasplante de bajos números de CSC aisladas en ratones inmunocomprometidos.

Las Tprogs, al igual que las CSC, tienen la capacidad de impulsar el crecimiento tumoral en un trasplante primario. Sin embargo, a diferencia de las CSC, no son capaces de recapitular la heterogeneidad celular del tumor parental y son menos eficientes para reiniciar la tumorigénesis en trasplantes subsiguientes debido a que las Tprogs típicamente sólo son capaces de un número finito de divisiones celulares, como lo demuestra el trasplante serial de bajos números de Tprog altamente purificadas en ratones inmunocomprometidos. Las Tprog se pueden dividir además en Tprog tempranas y Tprog tardías, las cuales se pueden distinguir por fenotipo (por ejemplo, marcadores de superficie celular) y sus diferentes capacidades para recapitular la arquitectura de la célula tumoral. Aunque ninguna puede recapitular un tumor en el mismo grado que las CSC, las Tprog tempranas tienen mayor capacidad para recapitular las características del tumor parental que las Tprog tardías. No obstante las anteriores distinciones, se ha demostrado que algunas poblaciones de Tprog pueden, en raras ocasiones, ganar capacidades de auto-renovación normalmente atribuidas a las CSC y pueden ellas mismas volverse CSC.

Las CSC exhiben mayor tumorigenicidad y son relativamente más inactivas que: (i) Tprog (Tprog tanto tempranas como tardías); y (ii) células no tumorigénicas, tales como células infiltrantes del tumor, por ejemplo, células de fibroblasto/estroma, endoteliales y hematopoyéticas que se pueden derivar de CSC y típicamente comprenden la parte principal del tumor. Dado que las terapias y los regímenes convencionales han sido diseñados, en gran parte, para extirpar tumores y atacar las células de rápida proliferación, las CSC son más resistentes a las terapias y regímenes convencionales que las Tprog de proliferación más rápida y otras poblaciones de células tumorales a granel tales como células no tumorigénicas. Otras características que pueden hacer que las

CSC sean relativamente quimiorresistentes a las terapias convencionales son mayor expresión de transportadores de resistencia a múltiples fármacos, mejores mecanismos de reparación de ADN y expresión génica anti-apoptótica. Estas propiedades de las CSC constituyen una razón clave del fracaso de los regímenes de tratamiento oncológicos estándar para asegurar un beneficio a largo plazo para la mayoría de los pacientes con neoplasias en estadios avanzados, ya que la quimioterapia estándar no apunta a las CSC que de hecho alimentan el continuo crecimiento y la recurrencia del tumor.

Sorprendentemente se ha descubierto que la expresión de CLDN (incluida la expresión de CLDN6) se asocia con diversas poblaciones de células tumorigénicas. La invención proporciona CAR de CLDN que pueden ser particularmente útiles para apuntar a células tumorigénicas y se pueden usar para silenciar, sensibilizar, neutralizar, reducir la frecuencia, bloquear, anular, interferir con, reducir, dificultar, restringir, controlar, anular, moderar, mediar, disminuir, reprogramar, eliminar o de otro modo inhibir (colectivamente, "inhibir") células tumorigénicas, con lo cual se facilita el tratamiento, el manejo y/o la prevención de trastornos proliferativos (por ejemplo, el cáncer). Ventajosamente, los nuevos CAR de CLDN de la invención se pueden seleccionar de modo que preferentemente reduzcan la frecuencia o la tumorigenicidad de células tumorigénicas tras su administración a un sujeto, independientemente de la forma del determinante de CLDN (por ejemplo, isotipo a o b). La reducción de la frecuencia de células tumorigénicas puede ocurrir como resultado de (i) inhibir o erradicar las células tumorigénicas; (ii) controlar el crecimiento, la expansión o la recurrencia de las células tumorigénicas; (iii) interrumpir la iniciación, propagación, mantenimiento o proliferación de las células tumorigénicas; o (iv) de otro modo dificultar la supervivencia, regeneración y/o metástasis de las células tumorigénicas. En algunas formas de realización, la inhibición de las células tumorigénicas puede ocurrir como resultado de un cambio en una o varias vías fisiológicas. El

cambio en la vía, ya sea por inhibición de las células tumorigénicas, modificación de su potencial (por ejemplo, por diferenciación inducida o alteración de nicho) o de otro modo interferencia con la capacidad de las células tumorigénicas para influir en el entorno tumoral o en otras células, permite el tratamiento más efectivo de trastornos asociados con CLDN al inhibir la tumorigénesis, el mantenimiento del tumor y/o la metástasis y recurrencia.

Los métodos que se pueden usar para evaluar la reducción en la frecuencia de células tumorigénicas incluyen, aunque no a modo de limitación, análisis citométricos o inmunohistoquímicos, preferentemente por análisis de dilución limitante *in vitro* o *in vivo* (Dylla *et al.* 2008, PMID: PMC2413402 y Hoey *et al.* 2009, PMID: 19664991).

La citometría de flujo y la inmunohistoquímica también pueden usarse para determinar la frecuencia de células tumorigénicas. Ambas técnicas emplean uno o varios anticuerpos o reactivos que se unen con proteínas o marcadores de superficie celular reconocidos en el arte, conocidos por enriquecer células tumorigénicas (véase WO 2012/031280). Como se sabe en el arte, la citometría de flujo (por ejemplo, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS)) también se puede usar para caracterizar, aislar, purificar, enriquecer o clasificar diversas poblaciones celulares, incluidas células tumorigénicas. La citometría de flujo mide los niveles de células tumorigénicas haciendo pasar una corriente de fluido, en la cual hay una población mixta de células suspendida, a través de un aparato de detección electrónica que es capaz de medir las características físicas y/o químicas de hasta miles de partículas por segundo. La inmunohistoquímica proporciona información adicional, ya que permite la visualización de células tumorigénicas *in situ* (por ejemplo, en una sección de tejido) tiñendo la muestra de tejido con anticuerpos o reactivos marcados que se unen con marcadores de células tumorigénicas.

A continuación se enumeran los marcadores que se han asociado con poblaciones de CSC y, en algunos casos, se han usado para aislar o

caracterizar CSC: ABCA1, ABCA3, ABCG2, ADCY9, ADORA2A, AFP, AXIN1, B7H3, BCL9, Bmi-1, BMP-4, C20orf52, C4.4A, carboxipeptidasa M, CAV1, CAV2, CD105, CD133, CD14, CD16, CD166, CD16a, CD16b, CD2, CD20, CD24, CD29, CD3, CD31, CD324, CD325, CD34, CD38, CD44, CD45, CD46, CD49b, CD49f, CD56, CD64, CD74, CD9, CD90, CEACAM6, CELSR1, CPD, CRIM1, CX3CL1, CXCR4, DAF, decorina, easyh1, easyh2, EDG3, eed, EGFR, ENPP1, EPCAM, EPHA1, EPHA2, FLJ10052, FLVCR, FZD1, FZD10, FZD2, FZD3, FZD4, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, GD2, GJA1, GLI1, GLI2, GPNMB, GPR54, GPRC5B, IL1R1, IL1RAP, JAM3, Lgr5, Lgr6, LRP3, LY6E, MCP, mf2, mlt3, MPZL1, MUC1, MUC16, MYC, N33, Nanog, NB84, nestina, NID2, NMA, NPC1, oncostatina M, OCT4, OPN3, PCDH7, PCDHA10, PCDHB2, PPAP2C, PTPN3, PTS, RARRES1, SEMA4B, SLC19A2, SLC1A1, SLC39A1, SLC4A11, SLC6A14, SLC7A8, smarcA3, smarcD3, smarcE1, smarcA5, Sox1, STAT3, STEAP, TCF4, TEM8, TGFB3, TMEM43, TMEM45, receptor de transferrina, TrkA, WNT10B, WNT16, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT5A, YY1 y catenina β . Véase, por ejemplo, Schulenburg *et al.*, 2010, PMID: 20185329, U.S.P.N. 7.632.678 y U.S.P.N.s. 2007/0292414, 2008/0175870, 2010/0275280, 2010/0162416 y 2011/0020221.

De manera similar, los ejemplos no limitativos de fenotipos de superficie celular asociados con CSC de ciertos tipos tumorales incluyen $CD44^{hi}CD24^{low}$, $ALDH^{+}$, $CD133^{+}$, $CD123^{+}$, $CD34^{+}CD38^{-}$, $CD44^{+}CD24^{-}$, $CD46^{hi}CD324^{+}CD66c^{-}$, $CD46^{hi}CD324^{+}CD66c^{+}$, $CD133^{+}CD34^{+}CD10^{-}CD19^{-}$, $CD138^{-}CD34^{-}CD19^{+}$, $CD133^{+}RC2^{+}$, $CD44^{+}\alpha_2\beta_1^{hi}CD133^{+}$, $CD44^{+}CD24^{+}ESA^{+}$, $CD271^{+}$, $ABCB5^{+}$ así como otros fenotipos de superficie de CSC conocidos en el arte. Véase, por ejemplo, Schulenburg *et al.*, 2010, *supra*, Visvader *et al.*, 2008, PMID: 18784658 y U.S.P.N. 2008/0138313. De particular interés con respecto a la presente invención son las preparaciones de CSC que comprenden fenotipos $CD46^{hi}CD324^{+}$.

Los niveles de expresión “positivo”, “bajo” y “negativo”, según se aplican a

marcadores o fenotipos de marcadores, se definen de la siguiente manera. Las células con expresión negativa (es decir, "–") se definen en la presente como aquellas células que expresan un nivel menor o igual al percentil 95 de la expresión observada con un anticuerpo de control de isotipo en el canal de fluorescencia en presencia del cóctel de tinción de anticuerpo completo que marca otras proteínas de interés en canales adicionales de emisión de fluorescencia. El especialista en el arte apreciará que este procedimiento para definir eventos negativos se denomina tinción de "fluorescencia menos uno", o "FMO". Las células con una expresión mayor al percentil 95 de la expresión observada con un anticuerpo de control de isotipo usando el procedimiento de tinción FMO descrito antes se definen en la presente como "positivas" (es decir, "+"). Según se define en la presente, existen diversas poblaciones de células ampliamente definidas como "positivas". Una célula se define como positiva si la expresión observada media del antígeno es superior al percentil 95 determinado usando tinción FMO con un anticuerpo de control de isotipo como se describió antes. Las células positivas se pueden denominar células con baja expresión (es decir, "lo") si la expresión observada media es superior al percentil 95 determinado por tinción FMO y está dentro de una desviación estándar del percentil 95. Alternativamente, las células positivas se pueden denominar células con alta expresión (es decir, "hi") si la expresión observada media es superior al percentil 95 determinado por tinción FMO y mayor a una desviación estándar por sobre el percentil 95. En otras formas de realización, el percentil 99 puede usarse preferentemente como punto de demarcación entre tinción FMO negativa y positiva, y en formas de realización particularmente preferidas, el percentil puede ser mayor al 99%.

El fenotipo de marcador $CD46^{hi}CD324^{+}$ y aquellos ejemplificados inmediatamente antes se pueden usar en conjunción con análisis por citometría de flujo estándar y técnicas de clasificación celular para caracterizar, aislar, purificar o enriquecer células TIC y/o TPC o poblaciones celulares para su

ulterior análisis.

La capacidad de los anticuerpos de la presente invención para reducir la frecuencia de células tumorigénicas por lo tanto se puede determinar usando las técnicas y los marcadores descritos antes. En algunos casos, CAR CLDN puede reducir la frecuencia de células tumorigénicas en un 10%, 15%, 20%, 25%, 30% o incluso 35%. En otras formas de realización, la reducción de la frecuencia de células tumorigénicas puede ser del orden del 40%, 45%, 50%, 55%, 60% o 65%. En ciertas formas de realización, la inmunoterapia adoptiva divulgada puede reducir la frecuencia de células tumorigénicas en un 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o incluso 95%. Se apreciará que cualquier reducción de la frecuencia de células tumorigénicas probablemente cause una correspondiente reducción en la tumorigenicidad, persistencia, recurrencia y agresividad de la neoplasia.

III. Terapia con receptores quiméricos de antígenos

Las inmunoterapias contra el cáncer apuntan a aprovechar la potencia del sistema inmune humano para erradicar tumores a través de la actividad de los linfocitos citotóxicos (que comprenden tanto linfocitos T como células NK). El hecho de que las respuestas inmunes mediadas por linfocitos citotóxicos podrían conducir a la erradicación de células tumorales residuales se infirió a partir de estudios que compararon las tasas de recaída en pacientes con leucemia que se habían sometido a diversos tipos de trasplante: se observó una significativa reducción de las tasas de recaída en pacientes que recibieron médula sin agotamiento de células T en trasplantes alogénicos a partir de hermanos HLA idénticos versus aquellos que recibieron trasplantes singénicos, y este efecto podría atribuirse a otras acciones mediadas por células T más allá de las respuestas de enfermedad injerto-versus-huésped. Sin embargo, la transferencia adoptiva clínicamente efectiva de células T antitumorales se ha visto impedida por el hecho de que la mayoría de los antígenos tumorales son auto-antígenos, y por lo tanto son poco inmunogénicos. La selección negativa

de células T que tienen receptores de células T (TCR) de alta afinidad que reconocen auto-antígenos se lleva a cabo en el timo durante el desarrollo, lo cual resulta en tolerancia central y selección de células T con reconocimiento de baja avidéz del tumor/auto-antígeno. Estas células T de baja avidéz luego tienen una consecuente activación débil de la función de células T antitumorales y limitada persistencia. Se están desplegando linfocitos citotóxicos genéticamente modificados en dos enfoques principales para esquivar este bloqueo de tolerancia/baja avidéz a la fuerte activación de células T antitumorales. En el primer enfoque, los antígenos tumorales de reconocimiento de TCR con afinidad mejorada son artificialmente introducidos en células T usando técnicas de ingeniería genética molecular. Este enfoque se ve limitado por varios factores, que incluyen la dificultad para expresar el TCR con afinidad mejorada en niveles que se aproximan a la expresión de TCR de tipo salvaje, el potencial de apareamiento erróneo de cadenas de TCR que surge cuando se introducen conjuntos adicionales de genes TCR en una célula T nativa, y la capacidad de las células tumorales para evadir el reconocimiento de TCR restringido por MHC por subregulación de moléculas MHC.

Un segundo enfoque a la ingeniería genética de linfocitos citotóxicos es la introducción de un receptor quimérico de antígeno (CAR) artificial, no restringido por MHC, en diversas poblaciones de linfocitos. Esto generalmente se logra cosechando poblaciones de linfocitos a granel que se cultivan, estimulan y expanden *ex vivo* previo a la transducción con vectores retrovirales o lentivirales que codifican la molécula CAR. Como un TCR nativo, el CAR debe poseer la capacidad para reconocer específica y selectivamente un antígeno blanco, y luego, tras la unión con este antígeno, transducir las señales apropiadas al linfocito para estimular las funciones efectoras y/o la producción de citoquinas necesaria para una respuesta inmunológica antitumoral sostenida. El concepto de células T modificadas por CAR surgió de estudios en los cuales se observó que el dominio ITAM citoplásmico de la cadena CD3 ζ

podía activar células T cuando se expresan independientemente del complejo de TCR:proteína CD3, en particular cuando el dominio CD3 ζ ITAM se fusionó con un dominio heterólogo extracelular y transmembrana. Un CD4–CD3 ζ CAR de primera generación fue transducido en células T y evaluado en pacientes con VIH. Los estudios de seguimiento demostraron que estas células T CAR modificadas genéticamente persistieron durante hasta una década luego de la infusión, lo cual es indicativo de cierta proliferación y persistencia de las células genéticamente modificadas. Posteriormente, se construyeron CAR antitumorales combinando en una sola molécula recombinante un dominio scFv y un dominio transmembrana con el dominio citoplásmico de la cadena CD3 ζ , y se pudo demostrar que el reconocimiento de antígeno de estas células T CAR genéticamente modificadas se redirigía para reflejar la especificidad del scFv (U.S.P.N. 7,446,179). Estas células T CAR dirigidas a scFv de primera generación fueron capaces de actuar como linfocitos citotóxicos no restringidos por MHC, reconociendo antígenos tumorales nativos en lugar de péptidos procesados, y promoviendo la lisis de células tumorales que expresan el antígeno nativo.

Aunque muchas de las células T CAR dirigidas a scFv de primera generación demostraron efectos esperados *in vitro*, los estudios *in vivo* en pacientes con cáncer fueron desalentadores por su falta de efectos antitumorales y falta de persistencia CAR–T. A medida que la biología de las células T se ha ido entendiendo mejor, se ha vuelto claro que las poblaciones de células T están compuestas por células efectoras de corta vida, células T de memoria centrales y periféricas de vida más larga, así como células T regulatorias (Treg) que interactúan con las otras subpoblaciones de células T. Central para la función de estas poblaciones es el rol de las señales coestimuladoras en la inducción de una activación persistente de células T naïve en reposo o de memoria a través de la producción de citoquinas, así como el rol que proporciona la coestimulación en la prevención de la anergia,

un estado de falta de respuesta de la célula T que potencialmente puede surgir de la señalización TCR:CD3 ζ exclusiva en ausencia de señales coestimuladoras. En particular, diversas señales coestimuladoras de proteínas tales como CD28, OX40, CD27, CD137/4–1BB, CD2, CD3, CD11a/CD18, CD54 y CD58 pueden ser beneficiosas para los niveles óptimos de producción de citoquinas, proliferación y expansión clonal, e inducción de la actividad citolítica. De éstas, CD28 tal vez sea la señal coestimuladora mejor entendida, y la coestimulación de CD28 ha demostrado aumentar la liberación de citoquinas por células T CAR activadas por antígeno. De manera similar, la señalización coestimuladora a través de CD137/4–1BB ha demostrado mejorar la proliferación de células T nativas, y puede contribuir a una mayor persistencia de CAR–T *in vivo*. Por lo tanto, se han diseñado los llamados constructos CAR de segunda generación en los cuales diversos dominios de señalización adicionales de estas moléculas han sido agregados en tándem al dominio CD3 ζ (U.S.P.N.s. 5.686.281 y 8.399.645). Se ha informado que las llamadas moléculas CAR de tercera generación, que incluyen tres o más dominios de señalización (por ejemplo, CD3 ζ y dos dominios de señalización coestimuladores) también se encuentran en desarrollo.

Varias moléculas CAR–T de segunda generación dirigidas al antígeno CD19 han demostrado potentes efectos antitumorales, así como una sustancial persistencia, en pacientes con malignidades hematológicas. Una importante frontera para las terapias CAR–T es la aplicación en el tratamiento de tumores sólidos. Con respecto a la presente invención, se ha descubierto sorprendentemente que los dominios de unión anti–CLDN se pueden integrar ventajosamente con cada uno de los mencionados receptores quiméricos de antígeno e inmunoterapias adoptivas para proporcionar tratamientos antineoplásicos efectivos que superen algunas de las limitaciones previas.

IV. Receptores quiméricos de antígeno

Como se mencionó anteriormente, los CAR de la presente invención

generalmente comprenden un dominio extracelular que comprende un dominio de unión a CLDN, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que activa ciertos linfocitos y genera una respuesta inmune dirigida a células tumorales CLDN positivas. Más generalmente, los receptores quiméricos de antígeno divulgados comprenden un ectodominio y un endodominio, cada uno definido por la pared de la célula huésped. En tal sentido, los términos “ectodominio” o “dominio extracelular” se refieren a la porción del polipéptido CAR fuera de la célula o exterior a la bicapa lipídica membranosa, que puede comprender los dominios de unión de reconocimiento de antígeno (por ejemplo, CLDN), una región bisagra opcional y cualquier dominio espaciador exterior a los residuos de aminoácidos que se extienden físicamente en la membrana. Por el contrario, los términos “endodominio” o “dominio intracelular” se refieren a la porción del polipéptido CAR dentro de la célula o interior a la bicapa lipídica membranosa, que puede comprender cualquier dominio espaciador interior a los residuos de aminoácidos que se extienden físicamente en la membrana, así como el dominio de señalización intracelular.

A. Dominios de unión de CLDN

1. Estructura del dominio de unión

Como se analiza extensamente en toda la presente divulgación, los receptores quiméricos de antígeno que comprenden un dominio de unión anti-CLDN se pueden usar ventajosamente para proporcionar terapias dirigidas para diversos trastornos proliferativos. Se apreciará que los dominios de unión anti-CLDN compatibles pueden comprender anticuerpos anti-CLDN o fragmentos inmunorreactivos de ellos. En ciertas formas de realización, los anticuerpos intactos o anticuerpos que comprenden al menos alguna porción del fc o dominio constante comprenden el dominio de unión a CLDN (véase, por ejemplo, U.S.P.N. 2015/0139943). En formas de realización particularmente preferidas, y como se demuestra en los ejemplos adjuntos a la presente, el

dominio de unión anti-CLDN puede comprender un scFv derivado de un anticuerpo monoclonal (incluidos anticuerpos monoclonales humanizados o con injerto de CDR) que se une con CLDN. Los anticuerpos compatibles que se pueden usar para proporcionar dominios de unión con CLDN consistentes con la presente invención se analizan en mayor detalle inmediatamente a continuación. A los fines de la presente solicitud, los términos “dominio de unión” y “anticuerpo” o “fragmento de anticuerpo” se pueden usar de manera indistinta, a menos que el contexto dicte lo contrario.

Los anticuerpos y las variantes y derivados de ellos, incluidos los sistemas de nomenclatura y numeración aceptados, han sido extensamente descritos, por ejemplo, en Abbas *et al.* (2010), *Cellular and Molecular Immunology* (6th Ed.), W.B. Saunders Company; o Murphey *et al.* (2011), *Janeway's Immunobiology* (8th Ed.), Garland Science.

Un “anticuerpo intacto” típicamente comprende una proteína tetramérica con forma de Y que comprende dos cadenas de polipéptidos pesadas (H) y dos livianas (L) mantenidas juntas por enlaces disulfuro covalentes e interacciones no covalentes. Cada cadena liviana está compuesta por un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). Cada cadena pesada comprende un dominio variable (VH) y una región constante, que, en el caso de los anticuerpos IgG, IgA e IgD, comprende tres dominios denominados CH1, CH2 y CH3 (IgM e IgE tienen un cuarto dominio, CH4). En las clases IgG, IgA e IgD, los dominios CH1 y CH2 están separados por una región bisagra flexible, que es un segmento rico en prolina y cisteína de longitud variable (de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 aminoácidos en distintas subclases de IgG). Los dominios variables en las cadenas livianas y pesadas están unidos a los dominios constantes por una región “J” de aproximadamente 12 aminoácidos o más, y la cadena pesada también tiene una región “D” de aproximadamente 10 aminoácidos adicionales. Cada clase de anticuerpo además comprende enlaces disulfuro inter-catenarios e intra-

catenarios formados por residuos de cisteína apareados.

Como se mencionó anteriormente, el término "anticuerpo" se debe interpretar de manera general e incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y primatizados, anticuerpos con injerto de CDR, anticuerpos humanos, anticuerpos producidos por vía recombinante, intracuerpos, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos monovalentes, anticuerpos multivalentes, anticuerpos anti-idiotípicos, anticuerpos sintéticos, incluyendo muteínas y variantes de ellos, fragmentos de anticuerpos inmuno-específicos tales como fragmentos Fd, Fab, F(ab')₂, F(ab'), fragmentos de cadena simple (por ejemplo, scFv y ScFvFc); y derivados de ellos, incluyendo fusiones Fc y otras modificaciones, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina inmunorreactiva en tanto exhiba una asociación o unión preferencial con un determinante de CLDN. Más aún, a menos que el contexto dicte lo contrario, el término además comprende todas las clases de anticuerpos (es decir, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) y todas las subclases (es decir, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), y todos los fragmentos inmunorreactivos de ellos. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos típicamente se denotan con la correspondiente letra griega en minúscula α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las cadenas livianas de los anticuerpos de cualquier especie vertebrada se pueden asignar a uno de dos tipos claramente diferentes, llamados kappa (κ) y lambda (λ), sobre la base de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. En síntesis, aquellos anticuerpos que se unen o asocian con CLDN humana son compatibles con las enseñanzas de la presente y se pueden usar como el componente de dominio de unión para los receptores quiméricos de antígeno divulgados.

Los dominios variables de los anticuerpos muestran considerable variación en la composición de los aminoácidos de un anticuerpo a otro, y son

principalmente responsables del reconocimiento y la unión al antígeno. Las regiones variables de cada par de cadena liviana/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo, de modo tal que un anticuerpo IgG intacto tiene dos sitios de unión (es decir, es bivalente). Los dominios VH y VL comprenden tres regiones de extrema variabilidad, que se denominan regiones hipervariables, o más comúnmente, regiones determinantes de complementariedad (CDR), enmarcadas y separadas por cuatro regiones menos variables conocidas como regiones de marco (FR). La asociación no covalente entre la región VH y la VL forma el fragmento Fv (para la "variable de fragmento") que contiene uno de los dos sitios de unión a antígeno del anticuerpo. De particular interés, los constructos scFv (para la variable de fragmento de cadena simple), que se pueden obtener por ingeniería genética como se discute más extensamente a continuación, unen las regiones VH y VL (preferentemente a partir del mismo anticuerpo) a través de un ligador peptídico. Dependiendo de la conformación deseada, se apreciará que el ligador peptídico puede tener distintas longitudes.

Según se usa en la presente, la asignación de aminoácidos a cada dominio, región de marco y CDR puede ser de acuerdo con uno de los esquemas de numeración provistos por Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (5th Ed.), US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242; Chothia *et al.*, 1987, PMID: 3681981; Chothia *et al.*, 1989, PMID: 2687698; MacCallum *et al.*, 1996, PMID: 8876650; o Dubel, Ed. (2007) *Handbook of Therapeutic Antibodies*, 3rd Ed., Wiley-VCH Verlag GmbH y Co o AbM (Oxford Molecular/MSI Pharmacopia), a menos que se indique lo contrario. Los residuos de aminoácidos que comprenden CDR según se define por los esquemas de Kabat, Chothia, MacCallum (también conocidos como Contact) y AbM, como se obtienen de la base de datos de sitio web de Abysis (*infra.*), se presentan a continuación.

TABLA 1

	Kabat	Chothia	MacCallum	AbM
VH CDR1	31–35	26–32	30–35	26–35
VH CDR2	50–65	52–56	47–58	50–58
VH CDR3	95–102	95–102	93–101	95–102
VL CDR1	24–34	24–34	30–36	24–34
VL CDR2	50–56	50–56	46–55	50–56
VL CDR3	89–97	89–97	89–96	89–97

Las regiones variables y CDR en una secuencia de anticuerpo se pueden identificar de acuerdo con reglas generales que se han desarrollado en el arte (como se explicó antes, tales como, por ejemplo, el sistema de numeración de Kabat) o alineando las secuencias contra una base de datos de regiones variables conocidas. Los métodos para identificar estas regiones se describen en Kontermann y Dubel, eds., *Antibody Engineering*, Springer, New York, NY, 2001 y Dinarello *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ, 2000. Las bases de datos ilustrativas de secuencias de anticuerpos se describen, y se puede acceder a ellas, en el sitio web "Abysis" en www.bioinf.org.uk/abs (mantenido por A.C. Martin del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular del University College London, Londres, Inglaterra) y el sitio web VBASE2 en www.vbase2.org, como se describe en Retter *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 33 (edición de base de datos): D671 –D674 (2005). Preferentemente, las secuencias de anticuerpos se analizan usando la base de datos Abysis, que integra datos de secuencias de Kabat, IMGT y el Banco de Datos de Proteínas (PDB) con datos estructurales del PDB. Véase Dr. Andrew C. R. Martin's book, capítulo *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*. En: *Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.: Duebel, S. y Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg, ISBN-13: 978-3540413547, también disponible en el sitio web

bioinform.org.uk/abs). El sitio web de la base de datos Abysis además incluye reglas generales que se han desarrollado para identificar CDR que se pueden usar de acuerdo con las enseñanzas de la presente. A menos que se indique lo contrario, todas las CDR proporcionadas en la presente se derivan de acuerdo con el sitio web de la base de datos Abysis según Kabat *et al.*

Para las posiciones de aminoácidos de región constante de cadena pesada discutidas en la invención, la numeración es de acuerdo con el índice Eu descrito por primera vez en Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63(1): 78–85, que describe la secuencia de aminoácidos de la proteína Eu de mieloma, que fuera reportada como la primera IgG1 humana secuenciada. El índice EU de Edelman también se establece en Kabat *et al.*, 1991 (*supra.*). Así, los términos “índice EU como se establece en Kabat” o “índice EU de Kabat” o “índice EU” en el contexto de la cadena pesada se refiere al sistema de numeración de residuos basado en el anticuerpo Eu de IgG1 humana de Edelman *et al.*, como se establece en Kabat *et al.*, 1991 (*supra.*). El sistema de numeración usado para la secuencia de aminoácidos de región constante de cadena liviana se establece de manera similar en Kabat *et al.*, (*supra.*). Un ejemplo de secuencia de aminoácidos de región constante de cadena liviana kappa compatible con la presente invención se presenta inmediatamente a continuación:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC (SEQ ID NO: 1).

De manera similar, un ejemplo de secuencia de aminoácidos de región constante de cadena pesada IgG1 compatible con la presente invención se presenta inmediatamente a continuación:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWAYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 2).

Las secuencias de región constante divulgadas, o las variaciones o derivados de ellas, se pueden asociar operativamente con las regiones variables de cadena pesada y liviana divulgadas usando técnicas de biología molecular estándar para proporcionar anticuerpos (de longitud completa o fragmentos inmunorreactivos que comprenden regiones fc parciales) que se pueden usar como tales o se pueden incorporar en CAR de CLDN de la invención (preferentemente como parte del dominio transmembrana).

Más generalmente, el componente de dominio de unión anti-CLDN de CAR compatibles se puede generar a partir de cualquier anticuerpo que reconozca específicamente o se asocie con al menos un determinante de CLDN (por ejemplo, CLDN4, CLDN6, CLDN9) o alguna combinación de ellos. Según se usa en la presente, “determinante” o “blanco” significa cualquier rasgo detectable, propiedad, marcador o factor que se asocie identificablemente con, o se halle específicamente en o sobre una célula particular, población de células o tejido. Los determinantes o blancos pueden ser de naturaleza morfológica, funcional o bioquímica, y son preferentemente fenotípicos. En ciertas formas de realización preferidas, un determinante es una proteína que es expresada diferencialmente (sobre- o sub-expresada) por tipos celulares específicos o por células en ciertas condiciones (por ejemplo, durante puntos específicos del ciclo celular o células de un nicho particular). A los fines de la presente invención, un determinante preferentemente se

expresa diferencialmente en células cancerígenas aberrantes y puede comprender una proteína miembro de la familia CLDN, o cualquiera de sus variantes de empalme, isoformas, homólogos o miembros de la familia, o dominios, regiones o epítomos específicos de ellos. Un “antígeno”, “determinante inmunogénico”, “determinante antigénico” o “inmunógeno” significa cualquier proteína o cualquier fragmento, región o dominio de ellos que pueda estimular una respuesta inmune cuando se introduce en un animal inmunocompetente y es reconocido por los anticuerpos producidos a partir de la respuesta inmune. La presencia o ausencia de los determinantes de CLDN contemplados en la presente se puede usar para identificar una célula, subpoblación celular o tejido (por ejemplo, tumores, células tumorigénicas o CSC).

2. Generación y producción de anticuerpos

Los anticuerpos compatibles con la invención se pueden producir usando una variedad de métodos conocidos en el arte, y cualquiera de esos anticuerpos se puede modificar adicionalmente para proporcionar el dominio de unión de los receptores quiméricos de antígeno anti-CLDN de la presente invención.

a. Generación de anticuerpos policlonales en animales huésped

La producción de anticuerpos policlonales en diversos animales huésped es bien conocida en el arte (véase, por ejemplo, Harlow y Lane (Eds.) (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press; y Harlow *et al.* (1989) *Antibodies*, NY, Cold Spring Harbor Press). A fin de generar anticuerpos policlonales, un animal inmunocompetente (por ejemplo, ratón, rata, conejo, cabra, primate no humano, etc.) se inmuniza con una proteína antigénica o células o preparaciones que comprenden una proteína antigénica. Luego de un período de tiempo, se obtiene suero que contiene el anticuerpo policlonal por sangrado o sacrificio del animal. El suero se puede usar en la forma obtenida del animal, o los anticuerpos se pueden purificar parcial o totalmente para proporcionar

fracciones de inmunoglobulina o preparaciones de anticuerpos aislados.

Cualquier forma de antígeno, o células o preparaciones que contienen el antígeno, se puede usar para generar un anticuerpo que sea específico para un determinante. El término "antígeno" se usa en un sentido amplio y puede comprender cualquier fragmento inmunogénico o determinante del blanco seleccionado, incluyendo un epítipo simple, epítopos múltiples, dominios simples o múltiples, o el dominio extracelular completo (ECD). El antígeno puede ser una proteína de longitud completa aislada, una proteína de superficie celular (por ejemplo, inmunizada con células que expresan al menos una porción del antígeno en su superficie) o una proteína soluble (por ejemplo, inmunizada únicamente con la porción ECD de la proteína). El antígeno se puede producir en una célula genéticamente modificada. Cualquiera de los antígenos antes mencionados se puede usar solo o en combinación con uno o varios adyuvantes mejoradores de la inmunogenicidad conocidos en el arte. El ADN que codifica el antígeno puede ser genómico o no genómico (por ejemplo, ADNc) y puede codificar al menos una porción del ECD, suficiente para generar una respuesta inmunogénica. Se puede emplear cualquier vector para transformar las células en las cuales se expresa el antígeno, incluyendo, aunque sin limitaciones, vectores adenovirales, vectores lentivirales, plásmidos y vectores no virales, tales como lípidos catiónicos.

b. Anticuerpos monoclonales

En formas de realización seleccionadas, la invención contempla el uso de anticuerpos monoclonales. El término "anticuerpo monoclonal" o "mAb" se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones (por ejemplo, mutaciones naturales), que pueden estar presentes en cantidades menores.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando una amplia

variedad de técnicas, que incluyen técnicas de hibridoma, técnicas recombinantes, tecnologías de despliegue de fagos, animales transgénicos (por ejemplo, XenoMouse[®]) o alguna combinación de ellos. Por ejemplo, en formas de realización preferidas, se pueden producir anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridoma e ingeniería bioquímica y genética, tales como aquellas descritas en mayor detalle en An, Zhigiang (ed.) *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*, John Wiley and Sons, 1st ed. 2009; Shire et al. (eds.) *Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing*, Springer Science + Business Media LLC, 1st ed. 2010; Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988; Hammerling, et al., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563–681 (Elsevier, N.Y., 1981). Luego de la generación de un número de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a un determinante, los anticuerpos particularmente adecuados se pueden seleccionar a través de diversos procesos de selección basados en, por ejemplo, la afinidad por el determinante o la tasa de internalización. En formas de realización particularmente preferidas, los anticuerpos monoclonales producidos como se describe en la presente se pueden usar como anticuerpos “fuente” y se pueden modificar adicionalmente para proporcionar dominios de unión CLDN efectivos que se puedan asociar con los CAR divulgados. Por ejemplo, el anticuerpo fuente se puede manipular para proporcionar scFv u otros fragmentos, mejorar la afinidad por el blanco, mejorar su producción en cultivo celular, reducir la inmunogenicidad *in vivo*, crear constructos multiespecíficos, etc. A continuación y en los Ejemplos adjuntos se brinda una descripción más detallada de la producción y selección de anticuerpos monoclonales.

c. Anticuerpos humanos

Los anticuerpos compatibles con la presente invención pueden

comprender anticuerpos completamente humanos. El término “anticuerpo humano” se refiere a un anticuerpo (preferentemente, un anticuerpo monoclonal) que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano y/o que ha sido hecha usando cualquiera de las técnicas para elaborar anticuerpos humanos descritas a continuación.

En una forma de realización, los anticuerpos humanos recombinantes se pueden aislar seleccionando una biblioteca de anticuerpos combinatorios recombinantes preparada usando despliegue de fagos. En una forma de realización, la biblioteca es una biblioteca de fagos scFv o de despliegue de levaduras, generada usando ADNC de VL y VH humanos preparados a partir de ARNm aislado de células B.

Los anticuerpos humanos también se pueden preparar introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los cuales los genes de inmunoglobulina endógenos han sido parcial o completamente inactivados y se han introducido genes de inmunoglobulina humanos. Tras el desafío, se observa la generación de anticuerpos, lo que se asemeja estrechamente a lo observado en humanos en todos los sentidos, incluyendo redistribución génica, ensamblaje y repertorio de anticuerpos completamente humanos. Este abordaje se describe, por ejemplo, en U.S.P.Ns. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y U.S.P.Ns. 6.075.181 y 6.150.584 respecto de la tecnología XenoMouse®; y Lonberg y Huszar, 1995, PMID: 7494109). Alternativamente, un anticuerpo humano se puede preparar por immortalización de linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno blanco (tales linfocitos B se pueden recuperar de un individuo que sufre de un trastorno neoplásico o puede haber sido inmunizado *in vitro*). Véase, por ejemplo, Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, 1991, PMID: 2051030; y U.S.P.N. 5.750.373. Al igual que con otros anticuerpos

monoclonales, dichos anticuerpos humanos se pueden usar como anticuerpos fuente.

d. Producción e ingeniería de anticuerpos

Los anticuerpos y fragmentos de ellos se pueden producir o modificar usando material genético obtenido de células productoras de anticuerpos y tecnología recombinante (véase, por ejemplo, Berger y Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology* vol. 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA; Sambrook y Russell (Eds.) (2000) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Ed.), NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel *et al.* (2002) *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, John & Sons, Inc.; y U.S.P.N. 7.709.611).

Como se discutirá en mayor detalle a continuación, otro aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios de unión a CLDN y CAR de la invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular, o en forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico es “aislado” o se vuelve sustancialmente puro cuando se separa de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándar, que incluyen tratamiento alcalino/SDS, bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en el arte. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN (por ejemplo, ADN genómico, ADNc), ARN y variantes artificiales de ellos (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos), ya sea de cadena simple o de cadena doble o ARN, y puede contener intrones o no. En una forma de realización preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden obtener y manipular usando técnicas estándar de biología molecular. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados como se

establece en los Ejemplos a continuación), los ADNc que codifican las cadenas liviana y pesada del anticuerpo se pueden obtener por técnicas estándar de amplificación por PCR o clonación de ADNc. Para los anticuerpos obtenidos de una biblioteca génica de inmunoglobulina (por ejemplo, usando técnicas de despliegue de fagos), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se puede recuperar de la biblioteca.

Los fragmentos de ADN que codifican segmentos de VH y VL se pueden manipular adicionalmente mediante técnicas estándar de ADN recombinante, por ejemplo para convertir los genes de región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, en genes de fragmento Fab o, preferentemente, en una secuencia de nucleótidos que codifica un scFv específico de CLDN. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH se une operativamente con otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un ligador flexible. El término “operativamente unido” u “operativamente enlazado”, según se usa en este contexto, significa que los dos fragmentos de ADN se unen de modo tal que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el marco.

El ADN aislado que codifica la región VH se puede convertir en un gen de cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN que codifica VH con otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes humanos de región constante de cadena pesada son conocidas en el arte (véase, por ejemplo, Kabat, *et al.* (1991) (*supra*)), y los fragmentos de ADN que comprenden estas regiones se pueden obtener por amplificación por PCR estándar. Las región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero con la máxima preferencia es una región constante de IgG1 o IgG4. Un ejemplo de región constante de IgG1 se presenta en SEQ ID NO: 2. Para un gen de cadena

pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica VH se puede unir operativamente con otra molécula de ADN que codifica únicamente la región constante de cadena pesada CH1.

El ADN aislado que codifica la región VL se puede convertir en un gen de cadena liviana de longitud completa (así como un gen de cadena liviana Fab) uniendo operativamente un ADN que codifica VL con otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena liviana, CL. Las secuencias de genes humanos de región constante de cadena liviana son conocidos en el arte (véase, por ejemplo, Kabat, *et al.* (1991) (*supra*)), y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener por amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena liviana puede ser una región constante kappa o lambda, pero con la máxima preferencia es una región constante kappa. En tal sentido, un ejemplo de región constante de cadena liviana kappa compatible se presenta en SEQ ID NO: 1.

La presente contempla ciertos polipéptidos (por ejemplo, regiones variables de anticuerpos) que exhiben "identidad de secuencia", similitud de secuencia" u "homología de secuencia" con los polipéptidos de la invención. Un polipéptido "homólogo" puede exhibir 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o 90% de identidad de secuencia. En otras formas de realización, un polipéptido "homólogo" puede exhibir 93%, 95% o 98% de identidad de secuencia. Según se usa en la presente, el porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de brechas (*gaps*), y la longitud de cada brecha, que deben introducirse para una alineación óptima de ambas secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitativos a continuación.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*,4:11–17 (1988)), que ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalidad de longitud de brecha de 12 y una penalidad de brecha de 4. Asimismo, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444–453 (1970), que ha sido incorporado en el programa GAP del paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de brecha de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

En forma adicional o alternativa, las secuencias de proteínas de la presente invención se pueden usar además como “secuencias de consulta” para realizar una búsqueda en bases de datos públicas a fin de identificar, por ejemplo, secuencias relacionadas. Dichas búsquedas se pueden realizar usando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403–10. Se pueden realizar búsquedas de proteínas BLAST con el programa XBLAST, puntaje=50, longitud de palabra=3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de anticuerpo de la invención. Para obtener alineaciones con brechas con fines comparativos, se puede utilizar el Gapped BLAST, como se describe en Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389–3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden emplear los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

Las posiciones de residuos que no son idénticas pueden diferir por sustituciones conservadoras de aminoácidos o por sustituciones no conservadoras de aminoácidos. Una “sustitución conservadora de aminoácidos” es aquella en la cual un residuo de aminoácido es sustituido por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral con similares

propiedades químicas (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución conservadora de aminoácidos no cambia sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En casos en los cuales dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de similitud se puede ajustar hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. En casos en los cuales hay una sustitución con un aminoácido no conservador, en formas de realización preferidas el polipéptido que exhibe identidad de secuencia conservará la función o actividad deseada del polipéptido de la invención (por ejemplo, el anticuerpo).

Contemplados en la presente se encuentran ácidos nucleicos que exhiben “identidad de secuencia”, similitud de secuencia” u “homología de secuencia” con los ácidos nucleicos de la invención. Una “secuencia homóloga” significa una secuencia de moléculas de ácido nucleico que exhibe al menos aproximadamente 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o 90% de identidad de secuencia. En otras formas de realización, una “secuencia homóloga” de ácidos nucleicos puede exhibir 93%, 95% o 98% de identidad de secuencia con las células de ácido nucleico o CSC referencia).

3. Anticuerpos derivados como dominios de unión de CLDN

Una vez que los anticuerpos fuente han sido generados, seleccionados y aislados como se describió antes, se pueden alterar adicionalmente para proporcionar componentes de dominio de unión CAR anti-CLDN compatibles con las enseñanzas de la presente. Preferentemente, los anticuerpos fuente son modificados o alterados usando técnicas conocidas de ingeniería molecular para proporcionar componentes de dominio de unión derivados que tienen las propiedades terapéuticas deseadas.

a. Anticuerpos quiméricos y humanizados

Como se discutió anteriormente, algunas formas de realización seleccionadas

de la invención comprenden anticuerpos monoclonales murinos que se unen inmunoespecíficamente con CLDN y, a los fines de la presente divulgación, se pueden considerar anticuerpos “fuente” para los dominios de unión CLDN. En formas de realización seleccionadas, los dominios de unión CLDN compatibles con la invención se pueden derivar de dichos anticuerpos fuente a través de la modificación opcional de la región constante y/o las secuencias de aminoácidos de unión a antígeno del anticuerpo fuente. En ciertas formas de realización, un anticuerpo se deriva de un anticuerpo fuente si aminoácidos seleccionados en el anticuerpo fuente son alterados por delección, mutación, sustitución, integración o combinación. En otra forma de realización, un anticuerpo “derivado” es un en el cual fragmentos del anticuerpo fuente (por ejemplo, una o varias CDR, o las regiones variables de cadena pesada y liviana enteras) se combinan o se incorporan en un constructo de dominio de unión aceptor para proporcionar el dominio de unión de CLDN derivado (por ejemplo, dominios de unión quiméricos o humanizados). Estos dominios de unión derivados se pueden generar usando técnicas estándar de biología molecular como se describe a continuación, tales como, por ejemplo, para proporcionar un scFv; para mejorar la afinidad por el determinante; para mejorar la estabilidad del anticuerpo; para mejorar la expresión; para reducir la inmunogenicidad *in vivo*; para reducir la toxicidad o para facilitar la transmisión de una señal. Dichos anticuerpos también se pueden derivar de anticuerpos fuente a través de la modificación de la molécula madura (por ejemplo, patrones de glucosilación o pegilación) por medios químicos o modificación post–translacional.

En una forma de realización, las regiones de unión quiméricas de la invención se derivan de segmentos de proteínas de al menos dos especies o clases de anticuerpos diferentes que se han unido covalentemente. El término anticuerpo “quimérico” se refiere a constructos en los cuales una porción de la cadena pesada y/o liviana es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en anticuerpos de una especie particular o pertenecientes a una

clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena es idéntico u homólogo a las correspondientes secuencias en anticuerpos de otra especie o perteneciente a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos (U.S. P.N. 4.816.567; Morrison *et al.*, 1984, PMID: 6436822). En algunas formas de realización preferidas, los anticuerpos quiméricos de la presente invención pueden comprender todas o la mayoría de las regiones variables de cadena pesada y liviana murinas seleccionadas operativamente unidas a todas o parte de las regiones constantes de cadena liviana y pesada humanas. En otras formas de realización particularmente preferidas, los dominios de unión CLDN se pueden “derivar” de los anticuerpos de ratón divulgados en la presente.

En otras formas de realización, los dominios de unión quiméricos de la invención son "injertados con CDR", donde las CDR (según se definen usando Kabat, Chothia, McCallum, etc.) se derivan de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la región de unión se deriva de un anticuerpo de otra especie o perteneciente a otra clase o subclase de anticuerpo. Para usar en humanos, una o varias CDR de roedores seleccionadas (por ejemplo, CDR de ratón) se pueden injertar en un dominio de unión aceptor humano (es decir, con regiones de marco humanas), reemplazando una o varias de las CDR naturales del anticuerpo humano. Estos constructos generalmente tienen las ventajas de proporcionar una unión efectiva mientras que reducen las respuestas inmunes no deseadas al dominio de unión por parte del sujeto. En formas de realización particularmente preferidas, los dominios de unión con injerto de CDR comprenden una o varias CDR obtenidas de un ratón incorporado en una secuencia de marco humana.

De manera similar al dominio de unión con injerto de CDR está el dominio de unión “humanizado”. Según se usa en la presente, un dominio de unión “humanizado” es un dominio de unión humano (dominio aceptor que

generalmente comprende regiones de marco humanas) que comprende una o varias secuencias de aminoácidos (por ejemplo, secuencias CDR) derivadas de uno o varios anticuerpos no humanos (un anticuerpo donante o fuente). En ciertas formas de realización, se pueden introducir “retro–mutaciones” en el dominio de unión humanizado, en donde los residuos en una o varias FR de la región variable del dominio de unión humano receptor son reemplazados por los correspondientes residuos de anticuerpos donantes de especies no humanas. Dichas retro–mutaciones pueden ayudar a mantener la apropiada configuración tridimensional de las CDR injertadas, y así mejorar la afinidad y la estabilidad del dominio de unión. Se pueden usar anticuerpos de diversas especies donantes, incluidos, sin limitaciones, ratón, rata, conejo o primate no humano. Más aún, los anticuerpos humanizados o fragmentos pueden comprender nuevos residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante para, por ejemplo, refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. Los anticuerpos con injerto de CDR y humanizados (y los dominios de unión CLDN relacionados) compatibles con la presente invención y que comprenden los anticuerpos fuente murinos presentados en los Ejemplos a continuación, por lo tanto se pueden obtener fácilmente sin una indebida experimentación, usando las técnicas del arte previo como se establece en la presente.

Se pueden usar además diversas técnicas reconocidas en el arte para determinar qué secuencias humanas usar como anticuerpos aceptores para proporcionar constructos humanizados de acuerdo con la presente invención. Las compilaciones de secuencias germinales humanas compatibles y métodos para determinar su adecuación como secuencias aceptoras se divulgan, por ejemplo, en Tomlinson, I. A. *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776–798; Cook, G. P. *et al.* (1995) *Inmunol. Today* 16: 237–242; Chothia, D. *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 227:799–817; y Tomlinson *et al.* (1995) *EMBO J* 14:4628–4638, cada uno de los cuales se incorpora a la presente en su totalidad. El directorio V–BASE

(VBASE2 – Retter *et al.*, Nucleic Acid Res. 33; 671–674, 2005), que proporciona un abarcativo directorio de secuencias de región variable de inmunoglobulina humana (compilado por Tomlinson, I. A. *et al.* MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK) también se puede usar para identificar secuencias aceptoras compatibles. Adicionalmente, las secuencias de marco humanas de consenso descritas, por ejemplo, en U.S.P.N. 6.300.064 también pueden resultar secuencias aceptoras compatibles para ser usadas de acuerdo con las presentes enseñanzas. En general, las secuencias aceptoras de marco humanas se seleccionan sobre la base de la homología con las secuencias de marco fuente murinas, junto con un análisis de las estructuras canónicas de CDR de los anticuerpos fuente y aceptor. Las secuencias derivadas de las regiones variables de cadena pesada y liviana del anticuerpo (o dominio de unión) derivado se pueden sintetizar luego usando técnicas reconocidas en el arte.

A modo de ejemplo, se describen anticuerpos con injerto de CDR y humanizados, y métodos asociados, en U.S.P.Ns. 6.180.370 y 5.693.762. Para más detalles, véase, por ejemplo, Jones *et al.*, 1986, PMID: 3713831); y U.S.P.Ns. 6.982.321 y 7.087.409.

La identidad u homología de secuencia de la región variable del anticuerpo con injerto de CDR o humanizado respecto de la región variable aceptora humana se puede determinar como se analiza en la presente y, cuando se mide como tal, preferentemente comparte al menos 60% o 65% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos 70%, 75%, 80%, 85% o 90% de identidad de secuencia, incluso más preferentemente al menos 93%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren en sustituciones conservadoras de aminoácidos. Una “sustitución conservadora de aminoácidos” es una en la cual un residuo de aminoácido es sustituido por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con similares propiedades químicas (por

ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución conservadora de aminoácidos no cambia sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En casos en los cuales dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de similitud se puede ajustar hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución.

Se apreciará que las CDR y secuencias de marco anotadas según se proporcionan en las FIGS. 3A y 3B adjuntas se definen según Kabat *et al.*, usando una base de datos propiedad de Abysis. Sin embargo, como se analiza en la presente, el especialista en el arte podría identificar fácilmente CDR de acuerdo con las definiciones provistas por Chothia *et al.*, ABM o MacCallum *et al.*, así como Kabat *et al.* Como tales, los anticuerpos humanizados anti-CLDN que comprenden una o varias CDR derivadas de acuerdo con cualquiera de los sistemas antes mencionados se encuentran explícitamente dentro del alcance de la presente invención.

b. Fragmentos, derivados o constructos de anticuerpos

En formas de realización particularmente preferidas, el dominio de unión a CLDN comprende un fragmento, derivado o constructo de anticuerpo. Más particularmente, independientemente de qué forma de anticuerpo se seleccione para poner en práctica la invención (por ejemplo, quimérico, humanizado, etc.), se apreciará que se pueden usar fragmentos inmunorreactivos de los mismos como parte de un CAR CLDN, de acuerdo con las enseñanzas de la presente. En un sentido amplio, un "fragmento de anticuerpo" comprende al menos una porción inmunorreactiva de un anticuerpo intacto. Es decir, según se usa en la presente, el término "fragmento de anticuerpo" incluye al menos un fragmento de unión a antígeno o una porción de un anticuerpo intacto, y el término "fragmento de unión a antígeno" se refiere a un fragmento de polipéptido de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une inmuno-específicamente o reacciona con un determinante inmunogénico de CLDN o compite con el

anticuerpo intacto a partir del cual se derivaron los fragmentos para la unión a antígeno específica. Más aún, a los fines de la presente invención, un “constructo de anticuerpo” o “derivado de anticuerpo” significa cualquier estructura molecular que comprende un fragmento de anticuerpo. Preferentemente, dichos derivados o constructos son no naturales y se fabrican para impartir propiedades moleculares beneficiosas mientras se mantiene la naturaleza inmunorreactiva (o inmuno-específica) del anticuerpo.

Los ejemplos de fragmentos, constructos o derivados de anticuerpos compatibles incluyen: fragmentos de cadena liviana variables (VL), fragmentos de cadena pesada variables (VH), scFv, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab, fragmentos Fd, fragmentos Fv, fragmentos de anticuerpos de dominio único, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos de cadena simple y anticuerpos multiespecíficos formados o derivados de fragmentos de anticuerpos. En otras formas de realización, el dominio de unión a CLDN de la presente invención puede comprender un anticuerpo intacto, un constructo scFv–Fc, un minicuerpo, un diacuerpo, un constructo scFv, un constructo Fab–scFv₂, un constructo Fab–scFv o un pepticuerpo. En ciertos aspectos, el dominio de unión a CLDN está unido covalentemente (por ejemplo, usando técnicas de ingeniería genética reconocidas en el arte) a los dominios transmembrana e intracelular del CAR. En otras formas de realización, el dominio de unión a CLDN puede estar unido no covalentemente (por ejemplo, a través de una porción Fc del dominio de unión, como se establece en las U.S.P.N. 2015/0139943) a los dominios transmembrana e intracelular del CAR. Cada forma de enlace al dominio de unión es compatible con la presente invención en tanto los linfocitos sensibilizados sean capaces de inducir la respuesta inmune deseada.

En formas de realización particularmente preferidas, y como se muestra en los Ejemplos adjuntos, el dominio de unión a CLDN comprende un constructo scFv. Según se usa en la presente, un “fragmento variable de

cadena simple (scFv)” significa un polipéptido de cadena simple derivado de un anticuerpo que conserva la capacidad para unirse con un antígeno. Un ejemplo del scFv incluye un anticuerpo polipéptido que se forma mediante una técnica de ADN recombinante y en el cual las regiones Fv de fragmentos de inmunoglobulina de cadena pesada y cadena liviana se unen a través de una secuencia espaciadora. Se conocen diversos métodos para preparar un scFv e incluyen los métodos descritos en U.S.P.N. 4.694.778. Los constructos scFv anti-CLDN compatibles con la presente invención se describen en mayor detalle en los Ejemplos adjuntos a la presente.

En otras formas de realización, el dominio de unión a CLDN es uno que comprende una región Fc y que conserva al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como unión a FcRn, modulación de vida media del anticuerpo, función ADCC y unión a complemento. En una forma de realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una vida media *in vivo* sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho dominio de unión puede comprender una región inmunorreactiva unida a una secuencia Fc que comprende al menos una cisteína libre capaz de conferir estabilidad *in vivo* al fragmento. En otras formas de realización, la región Fc puede modificarse usando técnicas reconocidas en el arte para modificar la farmacocinética o la farmacodinámica de los CAR y linfocitos sensibilizados divulgados.

Cuando el dominio de unión a CLDN comprende una porción Fc, puede estar unido o enlazado en forma no covalente con las restantes porciones del CAR a través de un receptor Fc extracelular o una molécula de unión (“enlazador Fc”) que está operativamente asociado con los dominios transmembrana e intracelular. Según se usa en la presente, el término “enlazador Fc” significa cualquier molécula o porción de ella que se une, o se asocia, con la porción Fc de un anticuerpo (por ejemplo, un receptor Fc).

Dichos constructos (es decir, un “proto–CAR” que comprende un enlazador Fc, dominio transmembrana y dominio de señalización intracelular) se pueden fabricar usando técnicas estándar de biología molecular y asociarse con los linfocitos seleccionados (autólogos o alogénicos), como se describe en la presente (por ejemplo, por transducción) para generar “linfocitos cebados”. En algún punto previo a la introducción en el paciente, los linfocitos cebados se pueden exponer a dominios de unión de CLDN seleccionados que comprenden al menos una porción Fc en condiciones que permitan la asociación del dominio de unión a CLDN(s) con el proto–CAR. La asociación no covalente del dominio de unión con el proto–CAR proporciona los linfocitos sensibles a CLDN de la presente invención, y se puede usar para inhibir la proliferación celular tumorigénica como se describe en la presente (véase en general U.S.P.N. 2015/0139943, la cual se incorpora a la presente en su totalidad).

En aquellas formas de realización que comprenden un proto–CAR, el enlazador Fc puede comprender un receptor Fc tal como un receptor Fc–gamma, un receptor Fc–alfa o un receptor Fc–épsilon. En ciertas formas de realización seleccionadas, el receptor Fc puede comprender el dominio de unión a ligando de CD16 (por ejemplo, CD16A o CD16B), CD32 (por ejemplo, CD32A o CD32B) o CD64 (por ejemplo, CD64A, CD64B o CD64C). En ciertas otras formas de realización, el enlazador Fc no es un receptor Fc. Por ejemplo, el enlazador Fc puede comprender toda o parte de la proteína A o la proteína G, en tanto el proto–CAR tenga la capacidad para asociarse con el dominio de unión a CLDN. En otras formas de realización, el enlazador Fc puede comprender un anticuerpo inmunorreactivo, o fragmento o constructo o derivado de éste, que se une con la porción Fc de una inmunoglobulina. En cuanto a dichas formas de realización, el enlazador Fc puede comprender, por ejemplo, un scFv, un nanocuerpo o un minicuerpo. De manera similar, los dominios de unión de CLDN compatibles con dichas formas de realización incluyen cualquier molécula que sea capaz de ser enlazada por el enlazador Fc

y reaccionar inmuno-específicamente con CLDN. En algunas formas de realización, el dominio de unión a CLDN comprende anticuerpos monoclonales CLDN intactos, o mezclas de anticuerpos monoclonales CLDN intactos. En otras formas de realización, el dominio de unión a CLDN puede comprender anticuerpos policlonales CLDN intactos (preferentemente, completamente humanos). En incluso otras formas de realización, el dominio de unión a CLDN puede comprender un constructo scFv–Fc. Más en general, el especialista en el arte será fácilmente capaz de identificar proto–CAR compatibles con las regiones de unión de CLDN sobre la base de las enseñanzas de la presente divulgación.

Más aún, como podrá reconocer fácilmente el especialista en el arte, los fragmentos, constructos o derivados divulgados se puede obtener por ingeniería molecular o por tratamiento químico o enzimático (tal como papaína o pepsina) de un anticuerpo intacto o completo, o cadena de anticuerpo, o por medios recombinantes. Véase, por ejemplo, *Fundamental Immunology*, W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1999), para obtener una descripción más detallada de los fragmentos de anticuerpos.

c. Selección post–producción

independientemente de cómo se obtengan, las células productoras de anticuerpos (por ejemplo, hibridomas, colonias de levaduras, etc.) se pueden seleccionar, clonar y clasificar adicionalmente en cuanto a las características deseables, que incluyen, por ejemplo, alta afinidad por CLDN. Los hibridomas se pueden expandir *in vitro* en cultivo celular o *in vivo* en animales singénicos inmunocomprometidos. Los métodos para seleccionar, clonar y expandir hibridomas y/o colonias son bien conocidos para el especialista en el arte. Una vez que se identifican los anticuerpos deseados, el material genético relevante se puede aislar, manipular y expresar usando técnicas de biología molecular y bioquímica comunes y reconocidas en el arte.

Los anticuerpos producidos por bibliotecas naïve (ya sea naturales o

sintéticas) pueden ser de moderada afinidad (K_a de aproximadamente 10^6 a 10^7 M^{-1}). Para mejorar la afinidad, la maduración de afinidad se puede imitar *in vitro* construyendo bibliotecas de anticuerpos (por ejemplo, introduciendo mutaciones aleatorias *in vitro* usando polimerasa proclive al error) y reseleccionando anticuerpos con alta afinidad por el antígeno a partir de dichas bibliotecas secundarias (por ejemplo, usando despliegue de fagos o levaduras). WO 9607754 describe un método para inducir la mutagénesis en una CDR de una cadena liviana de inmunoglobulina para crear una biblioteca de genes de cadena liviana.

Se pueden usar diversas técnicas para seleccionar anticuerpos, que incluyen, aunque sin limitaciones, despliegue de fagos o levaduras en el cual una biblioteca de anticuerpos combinatorios humanos o fragmentos scFv se sintetiza en fagos o levaduras, la biblioteca se selecciona con el antígeno de interés o una porción de unión a anticuerpo de éste, y se aísla el fago o la levadura que se une al antígeno, a partir del cual se pueden obtener los anticuerpos o fragmentos inmunorreactivos (Vaughan *et al.*, 1996, PMID: 9630891; Sheets *et al.*, 1998, PMID: 9600934; Boder *et al.*, 1997, PMID: 9181578; Pepper *et al.*, 2008, PMID: 18336206). Los kits para generar bibliotecas de despliegue de fagos o levaduras se encuentran disponibles en el comercio. También existen otros métodos y reactivos que se pueden emplear para generar y seleccionar bibliotecas de despliegue de anticuerpos (véase U.S.P.N. 5.223.409; WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; y Barbas *et al.*, 1991, PMID: 1896445). Dichas técnicas permiten ventajosamente la selección de grandes cantidades de anticuerpos candidatos y proporcionan una manipulación relativamente fácil de las secuencias (por ejemplo, por selección aleatoria recombinante).

4. Características de dominios de unión de CLDN

En formas de realización seleccionadas, las células productoras de

anticuerpos (por ejemplo, hibridomas o colonias de levaduras) se pueden seleccionar, clonar y clasificar adicionalmente en cuanto a las propiedades favorables, que incluyen, por ejemplo, un robusto crecimiento, alta producción del anticuerpo y, como se analiza en mayor detalle a continuación, características deseables del dominio de unión. En otros casos, las características del anticuerpo se pueden impartir seleccionando un antígeno particular (por ejemplo, un dominio CLDN específico) o un fragmento inmunorreactivo del antígeno blanco para la inoculación del animal. En incluso otras formas de realización, los anticuerpos seleccionados se pueden modificar por ingeniería genética, como se describió antes, para mejorar o refinar características inmunoquímicas tales como fragmentos de afinidad o farmacocinética.

a. Afinidad del dominio de unión

Divulgados en la presente hay anticuerpos que tienen una alta afinidad de unión por un determinante específico, por ejemplo CLDN6. El término " K_D " se refiere a la constante de disociación o afinidad aparente de una interacción anticuerpo–antígeno particular. Un anticuerpo de la invención se puede unir inmunoespecíficamente con su antígeno blanco cuando la constante de disociación K_D (k_{off}/k_{on}) es $\leq 10^{-7}$ M. El anticuerpo se une específicamente al antígeno con una alta afinidad cuando K_D es $\leq 5 \times 10^{-9}$ M, y con muy alta afinidad cuando K_D es $\leq 5 \times 10^{-10}$ M. En una forma de realización de la invención, el anticuerpo tiene una $K_D \leq 10^{-9}$ M y una tasa de desconexión (*off-rate*) de aproximadamente 1×10^{-4} /seg. En una forma de realización de la invención, la tasa de desconexión es $< 1 \times 10^{-5}$ /seg. En otras formas de realización de la invención, los anticuerpos se unen con un determinante con una K_D entre aproximadamente 10^{-7} M y 10^{-10} M, e incluso en otra forma de realización se une con una $K_D \leq 2 \times 10^{-10}$ M. Incluso otras formas de realización seleccionadas de la invención comprenden anticuerpos que tienen una K_D (k_{off}/k_{on}) de menos de 10^{-6} M, menos de 5×10^{-6} M, menos de 10^{-7} M, menos de

5×10^{-7} M, menos de 10^{-8} M, menos de 5×10^{-8} M, menos de 10^{-9} M, menos de 5×10^{-9} M, menos de 10^{-10} M, menos de 5×10^{-10} M, menos de 10^{-11} M, menos de 5×10^{-11} M, menos de 10^{-12} M, menos de 5×10^{-12} M, menos de 10^{-13} M, menos de 5×10^{-13} M, menos de 10^{-14} M, menos de 5×10^{-14} M, menos de 10^{-15} M o menos de 5×10^{-15} M.

En ciertas formas de realización, un anticuerpo de la invención que se une inmunoespecíficamente con un determinante, por ejemplo CLDN, puede tener una constante de tasa de asociación o k_{on} (o k_a) (anticuerpo + antígeno (Ag) $\xrightarrow{k_{on}}$ anticuerpo-Ag) de al menos $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, o al menos $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

En otra forma de realización, un anticuerpo de la invención que se une inmunoespecíficamente con un determinante, por ejemplo CLDN, puede tener una constante de tasa de disociación o k_{off} (o k_d) (anticuerpo + antígeno (Ag) $\xleftarrow{k_{off}}$ anticuerpo-Ag) de menos de 10^{-1} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-2} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-3} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-4} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-5} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-6} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-7} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-8} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-9} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ o menos de 10^{-10} s^{-1} .

La afinidad de unión se puede determinar usando diversas técnicas conocidas en el arte, por ejemplo, resonancia de plasmón en superficie, interferometría bio-capta, interferometría de polarización dual, dispersión de luz estática, dispersión de luz dinámica, calorimetría de titulación isotérmica, ELISA, ultracentrifugación analítica y citometría de flujo.

b. Categorización (*binning*) y mapeo de epítomos

Según se usa en la presente, el término “categorización (*binning*)” se refiere a métodos usados para agrupar anticuerpos (o dominios de unión) en “bins” sobre la base de sus características de unión a antígeno y si compiten o no

entre sí. La determinación inicial de bins se puede refinar adicionalmente y confirmar por mapeo de epítomos y otras técnicas según se describe en la presente. Sin embargo, se apreciará que la asignación empírica de anticuerpos a bins individuales proporciona información que puede ser indicativa del potencial terapéutico de los anticuerpos divulgados.

Más específicamente, se puede determinar si un anticuerpo de referencia seleccionado (o un fragmento de éste) compite por la unión con un segundo anticuerpo de ensayo (es decir, está en el mismo bin) usando métodos conocidos en el arte y establecidos en los Ejemplos de la presente. En una forma de realización, un anticuerpo de referencia se asocia con un antígeno CLDN en condiciones de saturación, y luego se determina la capacidad de un anticuerpo secundario o de ensayo para unirse con CLDN usando técnicas de inmunquímica estándar. Si el anticuerpo de ensayo es capaz de unirse sustancialmente con CLDN al mismo tiempo que el anticuerpo anti-CLDN de referencia, entonces el anticuerpo secundario o de ensayo se une con un epítomo diferente que el anticuerpo primario o de referencia. Sin embargo, si el anticuerpo de ensayo no es capaz de unirse sustancialmente con CLDN al mismo tiempo, entonces el anticuerpo de ensayo se une con el mismo epítomo, un epítomo solapado, o un epítomo que está en estrecha proximidad (al menos estéricamente) con el epítomo unido por el anticuerpo primario. Es decir, el anticuerpo de ensayo compite por la unión al antígeno y está en el mismo bin que el anticuerpo de referencia.

El término “competir” o “anticuerpo que compite”, cuando se usa en el contexto de los anticuerpos divulgados, significa la competencia entre anticuerpos según se determina por un ensayo en el cual un anticuerpo de ensayo o fragmento inmunológicamente funcional que está siendo evaluado inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común. Típicamente, dicho ensayo involucra el uso de antígeno purificado (por ejemplo, CLDN o un dominio o fragmento de éste) unido a una superficie sólida

o a células, un anticuerpo de ensayo no marcado y un anticuerpo de referencia marcado. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marca unida a la superficie sólida o células en presencia del anticuerpo de ensayo. Usualmente, el anticuerpo de ensayo está presente en exceso y/o se permite su unión en primer lugar. Los detalles adicionales sobre los métodos para determinar la unión competitiva se proporcionan en los Ejemplos de la presente. Usualmente, cuando un anticuerpo que compite está presente en exceso, inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia con un antígeno común en al menos 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75%. En algunos casos, la unión se inhibe en al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 97%, o más.

Por el contrario, cuando el anticuerpo de referencia se une, preferentemente inhibe la unión de un anticuerpo de ensayo agregado posteriormente (es decir, un anticuerpo CLDN) en al menos 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75%. En algunos casos, la unión del anticuerpo de ensayo se inhibe en al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 97%, o más.

Generalmente, la categorización (*binning*) o la unión competitiva se pueden determinar usando diversas técnicas reconocidas en el arte, tales como, por ejemplo, inmunoensayos tales como western blots, radioinmunoensayos, ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayos "en sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunorradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A. Tales inmunoensayos son de uso rutinario y bien conocidos en el arte (véase, Ausubel *et al*, eds, (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York). Además, se pueden usar ensayos de bloqueo cruzado (véase, por ejemplo, WO 2003/48731; y Harlow *et al*. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold

Spring Harbor Laboratory, Ed. Harlow and David Lane).

Otras tecnologías usadas para determinar la inhibición competitiva (y por ende “bins”), incluyen: resonancia de plasmón en superficie usando, por ejemplo, el sistema BIAcore™ 2000 (GE Healthcare); interferometría bio-capa usando, por ejemplo, un ForteBio® Octet RED (ForteBio); o ensayos de perlas por citometría de flujo usando, por ejemplo, un ensayo de detección FACSCanto II (BD Biosciences) o un multiplex LUMINEX™ (Luminex).

Luminex es una plataforma de inmunoensayo basada en perlas que permite el apareamiento de anticuerpos sometidos a multiplex a gran escala. El ensayo compara los patrones de unión simultánea de pares de anticuerpos con el antígeno blanco. Un anticuerpo de par (mAb de captura) se une a perlas Luminex, en donde cada mAb de captura se une a una perla de diferente color. El otro anticuerpo (mAb detector) se une a una señal fluorescente (por ejemplo, ficoeritrina (PE)). El ensayo analiza la unión simultánea (apareamiento) de anticuerpos con un antígeno y agrupa anticuerpos con similares perfiles de apareamiento. Los perfiles similares de un mAb detector y un mAb de captura indican que los dos anticuerpos se unen con el mismo epítipo o con epítipos estrechamente relacionados. En una forma de realización, los perfiles de apareamiento se pueden determinar usando coeficientes de correlación de Pearson para identificar los anticuerpos que se correlacionan más estrechamente con cualquier anticuerpo particular en el panel de anticuerpos que están siendo evaluados. En formas de realización preferidas, se determinará que un mAb de ensayo/detector está en el mismo bin que un mAb de referencia/captura si el coeficiente de correlación de Pearson del par de anticuerpos es al menos 0,9. En otras formas de realización, el coeficiente de correlación de Pearson es al menos 0,8, 0,85, 0,87 o 0,89. En otras formas de realización, el coeficiente de correlación de Pearson es al menos 0,91, 0,92, 0,93, 0,94, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98, 0,99 o 1. Otros métodos para analizar los datos obtenidos del ensayo Luminex se describen en U.S.P.N. 8.568.992. La

capacidad de Luminex para analizar 100 tipos diferentes de perlas (o más) simultáneamente proporciona superficies de antígeno y/o anticuerpo casi ilimitadas, lo cual da por resultado un mejor rendimiento y resolución en el perfil de epítipo de anticuerpo respecto de un ensayo de biosensor (Miller, *et al.*, 2011, PMID: 21223970).

“Resonancia en plasmón de superficie” se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones específicas en tiempo real por detección de alteraciones en las concentraciones de proteína dentro de una matriz de biosensor.

En otras formas de realización, una técnica que se puede usar para determinar si un anticuerpo de ensayo “compite” por la unión con un anticuerpo de referencia es la “interferometría bio–capa”, una técnica analítica óptica que analiza el patrón de interferencia de la luz blanca reflejada sobre dos superficies: una capa de proteína inmovilizada en una punta del biosensor, y una capa de referencia interna. Cualquier cambio en el número de moléculas unidas a la punta del biosensor causa una desviación en el patrón de interferencia que se puede medir en tiempo real. Dichos ensayos de interferometría bio–capa se pueden realizar usando una máquina ForteBio® Octet RED de la siguiente manera. Un anticuerpo de referencia (Ab1) se captura en un chip de captura anti–ratón, luego se usa una alta concentración de anticuerpo de no unión para bloquear el chip y se recolecta una medición basal. Luego la proteína blanco recombinante monomérica es capturada por el anticuerpo específico (Ab1), y la punta se sumerge en una cavidad con el mismo anticuerpo (Ab1) como control o en una cavidad con un anticuerpo de ensayo diferente (Ab2). Si no se produce más unión, como se determina comparando los niveles de unión con el Ab1 de control, entonces se determina que Ab1 y Ab2 son anticuerpos “que compiten”. Si se observa unión adicional con Ab2, entonces se determina que Ab1 y Ab2 no compiten entre sí. Este proceso se puede expandir para seleccionar grandes bibliotecas de anticuerpos

únicos usando una fila completa de anticuerpos en una placa de 96 cavidades que representa bins únicos. En formas de realización preferidas, un anticuerpo de ensayo compite con un anticuerpo de referencia si el anticuerpo de referencia inhibe la unión específica del anticuerpo de ensayo con un antígeno común en al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75%. En otras formas de realización, la unión se inhibe en al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 97%, o más.

Una vez que se ha definido un bin, que abarca un grupo de anticuerpos que compiten, se puede realizar una caracterización adicional para determinar el dominio o epítipo específico en el antígeno al cual se unen los anticuerpos de un bin. Se puede realizar un mapeo de epítopos a nivel del dominio usando una modificación del protocolo descrito por Cochran *et al.*, 2004, PMID: 15099763. El mapeo fino de epítopos es el proceso de determinar los aminoácidos específicos en el antígeno que comprenden el epítipo de un determinante al cual se une el anticuerpo. El término “epítipo” se usa en su sentido bioquímico común y se refiere a aquella porción del antígeno blanco capaz de ser reconocida y específicamente unida por un anticuerpo particular. En ciertas formas de realización, los epítopos o determinantes inmunogénicos incluyen agrupamientos en superficie químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, grupos fosforilo o grupos sulfonilo, y, en ciertas formas de realización, pueden tener características estructurales tridimensionales, y/o características de carga específicas. En ciertas formas de realización, se dice que un anticuerpo se une específicamente con un antígeno cuando reconoce preferentemente su antígeno blanco en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

Cuando el antígeno es un polipéptido tal como CLDN, los epítopos generalmente se pueden formar a partir de aminoácidos contiguos y aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína (“epítopos conformacionales”). En tales epítopos conformacionales,

los puntos de interacción ocurren en residuos de aminoácidos de la proteína que están separados linealmente entre sí. Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos (a veces denominados epítomos “lineales” o “continuos”) son típicamente retenidos tras la desnaturalización de la proteína, mientras que los epítomos formados por plegamiento terciario típicamente se pierden tras la desnaturalización de la proteína. Un epítomo de anticuerpo típicamente incluye al menos 3, y más usualmente, al menos 5 o 8–10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos de determinación de epítomos o “mapeo de epítomos” son bien conocidos en el arte y se pueden usar en conjunción con la presente divulgación para identificar epítomos en CLDN unidos por los anticuerpos divulgados.

Las técnicas de mapeo de epítomos compatibles incluyen mutantes de escaneo de alanina, blots de péptidos (Reineke (2004) *Methods Mol Biol* 248:443–63) o análisis de escisión de péptidos. Asimismo, se pueden emplear métodos tales como escisión de epítomos, extracción de epítomos y modificación química de antígenos (Tomer (2000) *Protein Science* 9: 487–496). Otros métodos compatibles comprenden métodos de despliegue de levaduras. En otras formas de realización, el Perfil Asistido por Modificación (MAP), también conocido como Perfil de Anticuerpos basado en la Estructura del Antígeno (ASAP), proporciona un método que categoriza grandes números de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el mismo antígeno de acuerdo con las similitudes del perfil de unión de cada anticuerpo para las superficies del antígeno química o enzimáticamente modificadas (U.S.P.N. 2004/0101920). Esta tecnología permite una rápida filtración de anticuerpos genéticamente idénticos, de modo tal que la caracterización se pueda enfocar en anticuerpos genéticamente distintos. Se apreciará que se puede usar MAP para clasificar los anticuerpos CLDN de la invención en grupos de anticuerpos que unen diferentes epítomos.

Una vez que se determina un epítomo deseado en un antígeno, es posible

generar anticuerpos para ese epítipo, por ejemplo, inmunizando con un péptido que comprende el epítipo usando técnicas descritas en la presente invención. Alternativamente, durante el proceso de descubrimiento, la generación y la caracterización de anticuerpos puede revelar información sobre los epítipos deseables ubicados en dominios o motivos específicos. A partir de esta información, es posible detectar competitivamente anticuerpos para unirse con el mismo epítipo. Un abordaje para lograr esto consiste en llevar a cabo estudios de competencia para hallar anticuerpos que compitan por la unión con el antígeno. Un proceso de alto rendimiento para realizar el *binning* de anticuerpos basado en su competencia cruzada se describe en WO 03/48731. Otros métodos de *binning* o mapeo de epítipos a nivel del dominio que comprenden la competencia de anticuerpos o la expresión de fragmentos de antígeno en levaduras son bien conocidos en el arte.

B. Región bisagra opcional

Según se usa en la presente, el término "región bisagra" se refiere a una región conectora de polipéptido flexible (también denominada en la presente "bisagra") que se puede incluir dentro del ectodominio de CAR y proporciona flexibilidad estructural a las regiones de polipéptidos de flanco. La región bisagra puede consistir en polipéptidos naturales o sintéticos. El especialista en el arte apreciará que las regiones bisagra pueden mejorar la función del CAR al promover un posicionamiento óptimo del dominio de reconocimiento de antígeno en relación con la porción del antígeno reconocida por el dominio de reconocimiento de antígeno. Se apreciará que, en algunas formas de realización, la región bisagra puede no requerirse para una óptima actividad de CAR. En otras formas de realización, una región bisagra beneficiosa que comprende una secuencia de aminoácidos corta promueve la actividad de CAR al facilitar la flexibilidad del dominio de unión a antígeno o anticuerpo. La secuencia que codifica la región bisagra se puede posicionar entre el resto de reconocimiento de antígeno (por ejemplo, un scFv anti-CLDN) y los dominios

transmembranas. La secuencia bisagra puede ser cualquier resto o secuencia derivada u obtenida a partir de cualquier molécula adecuada. En una forma de realización, por ejemplo, la secuencia bisagra se deriva de la molécula CD8 α humana o una molécula CD28. Una "región bisagra" derivada de una inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1) generalmente se define como extendida desde Glu216 hasta Pro230 de la IgG1 humana. Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG se pueden alinear con la secuencia de IgG1 colocando el primer y el último residuo de cisteína que forman enlaces disulfuro intercadena pesada (S-S) en las mismas posiciones. En otras formas de realización, la región bisagra puede ser de ocurrencia natural o de ocurrencia no natural, lo que incluye, aunque sin limitaciones, una región bisagra alterada como se describe en la patente estadounidense Nro. 5.677.425. Por supuesto, cuando ciertos dominios de unión tales como (Fab')₂ o un anticuerpo intacto se usan en el CAR, naturalmente se desprende que se incluirá la correspondiente región bisagra.

En otras formas de realización seleccionadas, la región bisagra puede incluir la región bisagra completa derivada de un anticuerpo de una clase o subclase diferente de aquella del dominio CH1. El término "región bisagra" también puede incluir regiones derivadas de una molécula CD8 α humana o una molécula CD28, y cualquier otro receptor que proporcione una función similar al brindar flexibilidad a las regiones de flaqueo. La región bisagra puede tener una longitud desde aproximadamente 4 aminoácidos hasta aproximadamente 50 aminoácidos, por ejemplo, desde aproximadamente 4 aa hasta aproximadamente 10 aa, desde aproximadamente 10 aa hasta aproximadamente 15 aa, desde aproximadamente 15 aa hasta aproximadamente 20 aa, desde aproximadamente 20 aa hasta aproximadamente 25 aa, desde aproximadamente 25 aa hasta aproximadamente 30 aa, desde aproximadamente 30 aa hasta aproximadamente 40 aa, o desde aproximadamente 40 aa hasta

aproximadamente 50 aa. Las regiones bisagra adecuadas se pueden seleccionar fácilmente y pueden ser de cualquiera de un número de longitudes adecuadas, tales como de 1 aminoácido (por ejemplo, Gly) a 20 aminoácidos, de 2 aminoácidos a 15 aminoácidos, de 3 aminoácidos a 12 aminoácidos, incluyendo de 4 aminoácidos a 10 aminoácidos, de 5 aminoácidos a 9 aminoácidos, de 6 aminoácidos a 8 aminoácidos, o de 7 aminoácidos a 8 aminoácidos, y puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

El especialista en el arte apreciará que las regiones bisagra compatibles son bien conocidas y, como tales, dichas formas de realización operativas pueden ser fácilmente seleccionadas e incorporadas en el CAR de CLDN de la presente invención.

C. Dominio transmembrana/espaciador

Como se mencionó anteriormente, el CAR de CLDN de la presente invención preferentemente comprende un dominio transmembrana que está interpuesto entre el dominio de unión extracelular de CDLN y/o región bisagra, y el dominio de señalización intracelular o citoplásmico. A los fines de la presente discusión, el término “dominio transmembrana” se usa con el entendimiento de que, aunque siempre incluye residuos de aminoácidos que son físicamente enterrados en la bicapa lipídica de una membrana celular, puede incluir dominios de soporte o “dominios espaciadores” que se extienden más allá de ambos lados de la membrana celular. El especialista en el arte puede distinguir fácilmente entre los aspectos funcionales de los componentes CAR y determinar fácilmente qué constituye un dominio transmembrana compatible en vista de la presente divulgación.

Se apreciará que el dominio transmembrana se puede derivar de un polipéptido natural, o se puede diseñar artificialmente. Los dominios transmembrana compatibles se pueden derivar de cualquier proteína de unión a membrana o transmembrana que se pueda modificar o truncar según sea necesario. Por ejemplo, los dominios transmembrana derivados de un receptor

de células T de cadena α o β , una región Fc de una IgG (tal como IgG4), una cadena CD3 ζ , CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154 o una GITR son todas compatibles con diversas formas de realización de los constructos CAR CLDN divulgados. En ciertas formas de realización, se prefiere emplear el dominio transmembrana de CD8 ζ , FcR η , Fc ϵ R1- γ y - β , MB1 (Ig α), B29 o CD3- γ , ζ o ϵ , a fin de conservar la asociación física con otros miembros del complejo receptor. Los dominios transmembrana artificiales compatibles pueden comprender diversas secuencias de polipéptidos que incorporan altos niveles de residuos hidrofóbicos, tales como leucina y valina. En otras formas de realización preferidas, el dominio transmembrana puede comprender un triplete de fenilalanina, triptófano y valina, que está ubicado en cada extremo del dominio transmembrana sintético.

Ciertas formas de realización de la invención comprenden dominios transmembrana que tienen un espaciador. En el CAR de CLDN de la presente invención, un “dominio espaciador” o “región espaciadora” es una secuencia de aminoácidos que se puede disponer entre un dominio funcional extracelular (por ejemplo, el dominio de unión a antígeno o la región bisagra, si está incluida) y el dominio transmembrana, o entre el dominio de señalización intracelular y el dominio transmembrana. El dominio espaciador significa cualquier oligopéptido o polipéptido que sirva para enlazar el dominio transmembrana con el dominio extracelular y/o el dominio transmembrana con el dominio intracelular, con la intención de posicionar de manera óptima estos elementos dentro del CAR de polipéptido para una eficiente función de CAR. El dominio espaciador comprende hasta 300 aminoácidos, preferentemente de 10 a 100 aminoácidos, y con la máxima preferencia de 25 a 50 aminoácidos. El dominio espaciador preferentemente tiene una secuencia que promueve la unión del CAR CLDN con CLDN y mejora la señalización transmembrana dentro de la célula. Los ejemplos de aminoácidos que se espera que

promuevan la unión incluyen cisteína, un aminoácido cargado, y serina y treonina en un potencial sitio de glucosilación, y estos aminoácidos se pueden usar como un aminoácido que constituye el dominio espaciador. En formas de realización preferidas, el espaciador puede comprender todo o parte de una región constante de anticuerpo (por ejemplo, IgG1 CH o CL), el cual puede opcionalmente dimerizar.

Otros espaciadores compatibles incluyen polímeros de glicina (G)_n, polímeros de glicina-serina, polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros espaciadores flexibles conocidos en el arte. Se pueden usar polímeros de glicina y glicina-serina; tanto Gly como Ser son relativamente desestructurados y, por lo tanto, pueden servir como atadura neutral entre componentes. Se pueden usar polímeros de glicina; la glicina accede a significativamente más espacio phi-psi que incluso la alanina, y está mucho menos restringida que los residuos de cadenas laterales más largas.

El especialista en el arte apreciará que los dominios transmembrana compatibles son bien conocidos en el arte y, como tales, se pueden seleccionar fácilmente formas de realización operativas e incorporarla en el CAR de CLDN de la presente invención.

D. Dominio de señalización intracelular

Además del dominio de unión de CLDN extracelular y el dominio transmembrana, el CAR de CLDN de la presente invención incorpora un dominio intracelular o citoplásmico que comprende al menos un resto de señalización y/o activación de células T. El dominio de señalización intracelular usado en la presente invención es una molécula que puede transmitir una o varias señales dentro de una célula cuando el dominio extracelular presente (o no covalentemente asociado) dentro de la misma molécula se une (interactúa) con CLDN. La unión de CLDN desencadena una señal que pasa por el CAR y se transmite intracelularmente para activar el linfocito sensibilizado. Esta activación de linfocito desencadena la respuesta inmune deseada, que resulta

en la eliminación de la célula blanco.

La teoría de dos señales de la activación de linfocitos T propone que se requieren dos señales para activar eficientemente las células T: primero, los péptidos antigénicos presentados en el contexto de una molécula MHC interactúan con el heterodímero de cadena alfa:beta del TCR, lo que conduce a cambios conformacionales que causan la activación de una señal desde los dominios citoplásmicos hallados en componentes de proteína del complejo TCR; y segundo, la transmisión de una señal desde el dominio citoplásmico de una única o varias moléculas coestimulatorias en tanto interactúan con sus ligandos cognados en la célula que presenta el complejo péptido:MHC. Más específicamente, se sabe que una señal generada sólo a través de un complejo TCR puede ser insuficiente para activar una célula T, y también se requiere una señal secundaria o coestimulatoria para evitar un estado de inactividad de las células T conocido como anergia. La activación natural de células T se transmite por dos tipos diferentes de secuencias de señalización citoplásmicas, es decir, una secuencia para iniciar la activación primaria dependiente de antígeno a través de un complejo TCR (secuencia de señalización citoplásmica primaria) y una secuencia para actuar el antígeno independientemente a fin de proporcionar una señal secundaria o coestimulatoria (secuencia de señalización citoplásmica secundaria). En un aspecto preferible, el CAR CLDN de la presente invención comprende la secuencia de señalización citoplásmica primaria y/o la secuencia de señalización citoplásmica secundaria como el endodominio de CAR.

En general, los motivos de señalización hallados en los dominios citoplásmicos de los receptores del sistema inmune pueden ser activadores o inhibitorios. La secuencia de señalización citoplásmica primaria que estimula la activación puede comprender un motivo de transducción de señal conocido como motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM) [Nature, vol. 338, pp. 383–384 (1989)]. Por otro lado, la secuencia de señalización

citoplásmica primaria que actúa de manera inhibitoria comprende un motivo de transducción de señal conocido como motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptor (ITIM). En la presente invención, se puede usar un dominio intracelular que tiene un ITAM o un ITIM.

La secuencia de señalización citoplásmica primaria que transmite la primera señal estimuladora para la activación de células T desde el complejo TCR nativo es un ITAM hallado en la cadena CD3 ζ , pero se sabe que también se pueden emplear otros ITAM para transmitir una señal activadora primaria positiva. Los ejemplos del dominio intracelular que tiene un ITAM que se pueden usar en la presente invención incluyen dominios intracelular que tienen ITAM derivados de CD3 ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. Específicamente, los ejemplos de ITAM incluyen péptidos que tienen secuencias de aminoácidos números 51 a 164 de CD3 ζ (NCBI RefSeq: NP_932170.1), aminoácidos números 45 a 86 de Fc ϵ RI γ (NCBI RefSeq: NP_004097.1), aminoácidos números 201 a 244 de Fc ϵ RI β (NCBI RefSeq: NP_000130.1), aminoácidos números 139 a 182 de CD3 γ (NCBI RefSeq: NP_000064.1), aminoácidos números 128 a 171 de CD3 δ (NCBI RefSeq: NP_000723.1), aminoácidos números 153 a 207 de CD3 ϵ (NCBI RefSeq: NP_000724.1), aminoácidos números 402 a 495 de CD5 (NCBI RefSeq: NP_055022.2), aminoácidos números 707 a 847 de 0022 (NCBI RefSeq: NP_001762.2), aminoácidos números 166 a 226 de CD79a (NCBI RefSeq: NP_001774.1), aminoácidos números 182 a 229 de CD79b (NCBI RefSeq: NP_000617.1), y aminoácidos números 177 a 252 de CD66d (NCBI RefSeq: NP_001806.2), y sus variantes que tienen la misma función que tienen estos péptidos. El número de aminoácidos basado en la información sobre secuencias de aminoácidos de NCBI RefSeq ID o GenBank descritas en la presente se asigna sobre la base de la longitud completa del precursor (que comprende una secuencia de péptidos de señal, etc.) de cada proteína.

La señal coestimuladora secundaria puede provenir del dominio citoplásmico

de una variedad de moléculas coestimuladoras, entre las cuales la mejor caracterizada es CD28. CD28 se expresa en células T y es el receptor para CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2). Sin embargo, otras moléculas coestimuladoras incluyen, aunque no a modo de limitación, la molécula CD27, la molécula CD137/4-1BB, la molécula CD134/OX40 y otras moléculas de señalización intracelular conocidas en el arte. Se sabe que CD134/OX40 mejora la expansión clonal de células T, probablemente por supresión de la apoptosis, y puede jugar un papel en el establecimiento de células de memoria. 4-1BB, también conocida como CD137, transmite una potente señal coestimuladora a las células T, promoviendo la diferenciación y mejorando la supervivencia a largo plazo de los linfocitos T. Dado que cada una de estas moléculas coestimuladoras activa diferentes vías de señalización intracelular y puede tener distintos efectos en diferentes poblaciones de linfocitos T, los dominios de una, varias o cada una pueden incluirse en el endodominio del CAR a fin de maximizar la activación de células T y otras propiedades deseadas del CAR. En una forma de realización preferida, las moléculas CD28, CD27, 4-1BB y OX40 son humanas. Los ejemplos del dominio intracelular que comprende una secuencia de señalización citoplásmica secundaria que se puede usar en la presente invención incluyen secuencias derivadas de CD2, CD4, CD5, CD8 α , CD8 β , CD28, CD134, CD137, ICOS y CD154. Los ejemplos específicos de ellos incluyen péptidos que tienen secuencias de aminoácidos números 236 a 351 de CD2 (NCBI RefSeq: NP-001758.2), aminoácidos números 421 a 458 de CD4 (NCBI RefSeq: NP-000607.1), aminoácidos números 402 a 495 de CD5 (NCBI RefSeq: NP-055022.2), aminoácidos números 207 a 235 de CD8 α (NCBI RefSeq: NP-001759.3), aminoácidos números 196 a 210 de CD8 β (GenBank: AAA35664.1), aminoácidos números 181 a 220 (SEQ ID NO.: 25) de CD28 (NCBI RefSeq: NP-006130.1), aminoácidos números 214 a 255 de CD137 (4-1BB, NCBI RefSeq: NP-001552.2), aminoácidos números 241 a 277 de CD134 (OX40, NCBI RefSeq: NP-003318.1), y aminoácidos números 166 a

199 de ICOS (NCBI RefSeq: NP-036224.1), y sus variantes que tienen la misma función que tienen estos péptidos.

Los dominios de señalización/ activación del CAR CLDN codificados por la secuencia de ácido nucleico divulgada pueden comprender cualquiera de los dominios de señalización antes mencionados, y uno o varios cualesquiera de los dominios activadores de células T intercelulares antes mencionados en cualquier combinación. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de la invención puede codificar un CAR que comprende un dominio de señalización CD28 y dominios desactivadores de células T intracelulares de CD28 y CD3 ζ . Alternativamente, por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico de la invención pueden codificar un CAR que comprende un dominio de señalización CD8 α y dominios de señalización de células T de CD28, CD3 ζ , la cadena gamma del receptor Fc (FcR γ) y/o 4-1BB.

El especialista en el arte apreciará que cada uno de los mencionados dominios de señalización/estimulación son compatibles con la presente invención y se pueden usar efectivamente (solos o preferentemente en combinación) con los CAR de CLDN divulgados. Por consiguiente, cada uno de los mencionados restos, en cualquier combinación o configuración, están expresamente contemplados como dentro del alcance de la presente invención como componentes del dominio intracelular/ citoplásmico.

V. Ácidos nucleicos y vectores de CAR

La invención proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada o purificada que codifica un receptor quimérico de antígeno anti-CLDN, en donde el CAR preferentemente comprende un dominio de unión extracelular (por ejemplo, un scFv), un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular (por ejemplo, un resto de activación de células T). Según se usa en la presente, “secuencia de ácido nucleico” tiene por fin abarcar un polímero de ADN o ARN, es decir, un polinucleótido, que puede ser de cadena simple o de cadena doble, y que puede contener nucleótidos no naturales o alterados. Los términos “ácido

nucleico” y “polinucleótido”, según se usan en la presente, se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea ribonucleótidos (ARN) o desoxirribonucleótidos (ADN). Estos términos se refieren a la estructura primaria de la molécula, y así incluyen ADN de cadena doble y simple, y ARN de cadena doble y simple. Los términos incluyen, como equivalentes, análogos de ARN o ADN hechos a partir de análogos nucleótidos y polinucleótidos modificados, tales como, aunque sin limitaciones, polinucleótidos metilados y/o limitados.

Por “aislado” se entiende la remoción de un ácido nucleico de su entorno natural. Por “purificado” se entiende que un ácido nucleico dado, ya sea uno que ha sido sacado de la naturaleza (incluidos ADN genómico y ARNm) o sintetizado (incluido ADNc) y/o amplificado en condiciones de laboratorio, ha logrado mayor pureza, en donde “pureza” es un término relativo, no “absoluta pureza”. Ha de entenderse, sin embargo, que los ácidos nucleicos y proteínas se pueden formular con diluyentes o adyuvantes, y aún con fines prácticos pueden ser aislados. Por ejemplo, los ácidos nucleicos típicamente se mezclan con un portador o diluyente aceptable cuando se usan para introducir en las células.

Según se describe en la presente y se muestra en los Ejemplos adjuntos, las secuencias de ácido nucleico compatibles con la invención se pueden generar usando métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico, polipéptidos y proteínas se pueden producir en forma recombinante usando metodología estándar de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001). Además, una secuencia de ácido nucleico producida sintéticamente que codifica el CAR CLDN se puede aislar y/o purificar a partir de una fuente, tal como una célula CHO, planta, bacteria, insecto o mamífero, por ejemplo, rata, humano, etc. Los métodos de aislación y purificación son bien conocidos en el arte. Alternativamente, las

secuencias de ácido nucleico descritas en la presente se pueden sintetizar comercialmente. En tal sentido, la secuencia de ácido nucleico de la invención puede ser sintética, recombinante, aislada y/o purificada.

Una secuencia de ácido nucleico de la invención puede codificar un CAR CLDN de cualquier longitud, es decir, el CAR puede comprender cualquier número de aminoácidos, siempre y cuando el CAR conserve su actividad biológica, por ejemplo, la capacidad para unirse específicamente con el antígeno y tratar o prevenir una enfermedad en un mamífero, etc. Por ejemplo, el CAR puede comprender 50 o más, 60 o más, 100 o más, 250 o más, o 500 o más aminoácidos. Preferentemente, el CAR tiene aproximadamente 50 hasta aproximadamente 700 aminoácidos (por ejemplo, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 550, o aproximadamente 650 aminoácidos), aproximadamente 100 hasta aproximadamente 500 aminoácidos (por ejemplo, aproximadamente 125, aproximadamente 175, aproximadamente 225, aproximadamente 250, aproximadamente 275, aproximadamente 325, aproximadamente 350, aproximadamente 375, aproximadamente 425, aproximadamente 450, o aproximadamente 475 aminoácidos), o un rango definido por cualesquiera dos de los anteriores valores.

Incluidas dentro del alcance de la invención se encuentran secuencias de ácido nucleico que codifican porciones funcionales del CAR CLDN descrito en la presente. El término "porción funcional", cuando se usa en referencia a un CAR, se refiere a cualquier parte o fragmento del CAR de la invención, donde la parte o fragmento conserva la actividad biológica del CAR del cual es parte (el CAR original). Las porciones funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas partes de un CAR que conservan la capacidad para reconocer células blanco o proporcionar una señal inmunomodulatoria, o tratar una enfermedad, en un grado similar, el mismo grado o en un grado mayor respecto del CAR original.

En referencia a una secuencia de ácido nucleico que codifica el CAR CLDN original, una secuencia de ácido nucleico que codifica una porción funcional del CAR puede codificar una proteína que comprende, por ejemplo, aproximadamente 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95% o más, del CAR original. En tal sentido, las secuencias de ácido nucleico compatible pueden codificar una porción funcional de un CAR que contiene aminoácidos adicionales en el término amino o carboxi de la porción, o en ambos términos, donde los aminoácidos adicionales no se hallan en la secuencia de aminoácidos del CAR original. Preferiblemente, los aminoácidos adicionales no interfieren con la función biológica de la porción funcional, por ejemplo, reconocer células blanco, detectar el cáncer, tratar o prevenir el cáncer, etc. Más preferiblemente, los aminoácidos adicionales mejoran la actividad biológica del CAR, en comparación con la actividad biológica del CAR original. La invención también proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican variantes funcionales del CAR CLDN. El término "variante funcional", según se usa en la presente, se refiere a un CAR, un polipéptido o una proteína que tiene sustancial o significativa identidad de secuencia o similitud con el CAR codificado por las secuencias de ácido nucleico divulgadas, en donde la variante funcional conserva la capacidad de unión de CLDN del CAR del cual es una variante. Las variantes funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas variantes del CAR descritas en la presente (el CAR original) que conservan la capacidad para reconocer células blanco CLDN positivas en un grado similar, el mismo grado o en un grado mayor respecto del CAR original. En referencia a una secuencia de ácido nucleico que codifica el CAR original, una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante funcional del CAR puede ser, por ejemplo, aproximadamente 10% idéntica, aproximadamente 25% idéntica, aproximadamente 30% idéntica, aproximadamente 50% idéntica, aproximadamente 65% idéntica, aproximadamente 80% idéntica, aproximadamente 90% idéntica, aproximadamente 95% idéntica o

aproximadamente 99% idéntica a la secuencia de ácido nucleico que codifica el CAR original.

Independientemente de la forma precisa del CAR CLDN, se apreciará que los ácidos nucleicos de la presente invención se pueden usar para la transformación *ex vivo* de células huésped seleccionadas (por ejemplo, linfocitos) o se pueden introducir directamente en el sujeto para la terapia génica *in vivo*. En cada caso, los ácidos nucleicos divulgados se pueden combinar con una sustancia que promueve la transferencia de un ácido nucleico dentro de una célula, por ejemplo, un reactivo para introducir un ácido nucleico tal como un liposoma o un lípido catiónico, además de otros excipientes divulgados en la presente. En ciertas formas de realización preferidas, los ácidos nucleicos de la presente invención se combinan o integran en un vector que es adecuado para la terapia génica *in vivo*.

Por consiguiente, en conjunción con lo que precede, la presente invención proporciona composiciones que comprende, ácidos nucleicos de CAR CLDN que, junto con un portador farmacéuticamente aceptable, se pueden usar como ingrediente activo o para generar linfocitos sensibilizados. Los aditivos farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos por el especialista en el arte. Los ejemplos de aditivos o excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina abuferada con fosfato (por ejemplo, 0,01 M fosfato, 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl, pH 7,4), una solución acuosa que contiene una sal de ácido mineral tal como un clorhidrato, un bromhidrato, un fosfato o un sulfato, solución salina, una solución de glicol o etanol, y una sal de un ácido orgánico tal como un acetato, un propionato, un malonato o un benzoato. También se puede usar un adyuvante tal como un agente humectante o un emulsionante, y un agente amortiguador del pH. Las composiciones de la presente invención se pueden formular en una forma conocida, adecuada para la administración parenteral, por ejemplo, por inyección o infusión. Además, dichas composiciones pueden comprender

aditivos de formulación tales como un agente de suspensión, un conservante, un estabilizante y/o un dispersante, y un agente de conservación para extender el término de validez durante el almacenamiento. Asimismo, la composición puede estar en forma seca para su reconstitución con un líquido estéril apropiado antes de su uso.

Además de la secuencia de ácido nucleico que codifica el CAR CLDN, los vectores compatibles preferentemente comprenden secuencias de control de expresión, tales como promotores, mejoradores, señales de poliadenilación, terminadores de transcripción, sitios de entrada ribosomal internos (IRES) y similares, que proporcionan la expresión de la secuencia de ácido nucleico en una célula huésped. En tal sentido, un gran número de promotores, incluidos promotores constitutivos, inducibles y represibles, de una variedad de fuentes diferentes son bien conocidos en el arte. Las fuentes de promotores representativas incluyen, por ejemplo, virus, mamíferos, insectos, plantas, levaduras y bacterias, y los promotores adecuados de estas fuentes son fácilmente obtenibles, o se pueden preparar sintéticamente, sobre la base de secuencias disponibles públicamente, por ejemplo, de depósitos tales como el ATCC, así como de otras fuentes comerciales o individuales. Los promotores pueden ser unidireccionales (es decir, iniciar la transcripción en una dirección) o bidireccionales (es decir, iniciar la transcripción en dirección 3' o 5'). Los ejemplos no limitativos de promotores incluyen, por ejemplo, el sistema de expresión bacteriana T7, el sistema de expresión bacteriana pBAD (araA), el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor de SV40 y el promotor de RSV. Los promotores inducibles incluyen, por ejemplo, el sistema Tet, el sistema inducible Ecdysone, el sistema T-REX™ (Invitrogen, Carlsbad, California), el sistema LACSWITCH™ (Stratagene, San Diego, California) y el sistema de recombinasa inducible por Cre-ERT tamoxifeno. Además, el CAR CLDN se puede asociar con un gen que puede ser un marcador para confirmar la expresión del ácido nucleico (por ejemplo, un gen de resistencia al fármaco,

un gen que codifica una enzima reportera o un gen que codifica una proteína fluorescente).

En ciertas formas de realización, el ácido nucleico que codifica el CAR CLDN, junto con cualquier elemento de control, preferentemente puede insertarse en un vector que luego se puede introducir en una célula seleccionada para proporcionar los linfocitos sensibles a CLDN divulgados. En formas de realización preferidas, el vector puede ser, por ejemplo, un plásmido, un transposón, un cósmido o un vector viral (por ejemplo, fago, retroviral, lentiviral o adenoviral). Por ejemplo, se puede usar un vector de virus tal como un vector de retrovirus (incluyendo un vector de oncorretrovirus, un vector de lentivirus y un vector de pseudo tipo), un vector de adenovirus, un vector de virus adenoasociado (AAV), un vector de virus de simio, un vector de virus vaccinia o un vector de virus sendai, un vector de virus Epstein–Barr (EBV) y un vector de HSV.

Más en general, los términos “vector”, “vector de clonación” y “vector de expresión” significan el vehículo por el cual una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen foráneo que codifica un CAR CLDN) se puede introducir en una célula huésped, de modo de transformar el huésped y promover la expresión (por ejemplo, la transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Se apreciará que el gen o secuencia introducida puede incluir secuencias regulatorias o de control, tales como inicio, final, promotor, señal, secreción u otras secuencias usadas por la maquinaria genética de la célula. Según se describe en la presente, los vectores compatibles son bien conocidos en el arte e incluyen plásmidos, transposones, fagos, virus, etc. El vector puede luego usarse para transformar los linfocitos seleccionados (autólogos o alogénicos) para proporcionar los linfocitos sensibilizados divulgados. A los fines de la presente divulgación, el término “transformar” o “transformación” se usa en su sentido más general y significa la introducción de un gen heterólogo, secuencia de ADN o ARN en una célula huésped (procariota o eucariota), de

modo que la célula huésped exprese el gen o la secuencia introducida para producir una sustancia deseada, típicamente una proteína o enzima codificada por el gen o la secuencia introducida. Los ejemplos de métodos de transformación celular compatibles con la invención comprenden transfección y transducción. Según se usa en la presente, el término “transfección” significa la introducción de un ácido nucleico o gen foráneo en una célula (procariota o eucariota) usando medios físicos o químicos, mientras que el término “transducción” significa la introducción de un ácido nucleico o gen foráneo en una célula (procariota o eucariota) a través del uso de un vector viral.

En términos de transducción, se pueden introducir vectores de fago o virales en las células huésped, preferentemente luego del crecimiento de partículas infecciosas en células de empaquetamiento adecuadas, muchas de las cuales están disponibles en el comercio. Los métodos de transducción compatibles y las células de empaquetamiento se presentan en los Ejemplos a continuación y son fácilmente discernibles para el especialista en el arte en vista de la presente divulgación.

A modo de ejemplo, cuando se ha de usar un vector de retrovirus, las composiciones compatibles con las enseñanzas de la presente se pueden generar seleccionando una célula de empaquetamiento adecuada sobre la base de una secuencia de LTR y una secuencia de señal empaquetadora poseída por el vector y preparando una partícula de retrovirus usando la célula empaquetadora. Los ejemplos de célula empaquetadora incluyen PG13 (ATCC CRL-10686), PA317 (ATCC CRL-9078), GP+E-86 y GP+envAm-12, y Psi-Crip. Una partícula de retrovirus también se puede preparar usando una célula 293 o una célula 293T que tiene alta eficiencia de transfección. Muchos tipos de vectores de retrovirus producidos sobre la base de retrovirus y células empaquetadoras que se pueden usar para empaquetar los vectores de retrovirus están ampliamente disponibles en el comercio de muchas empresas. Similares sistemas también están comercialmente disponibles para la

fabricación de vectores lentivirales compatibles de acuerdo con las enseñanzas de la presente. Dichos vectores se pueden usar para transducir poblaciones de linfocitos seleccionadas a fin de proporcionar los linfocitos sensibles a CLDN deseados.

Además, se pueden usar sistemas de vectores de empaquetamiento no virales en la presente invención en combinación con un liposoma y un agente condensador tal como un lípido catiónico, como se describe en WO 96/10038, WO 97/18185, WO 97/25329, WO 97/30170 y WO 97/31934 (las cuales se incorporan a la presente por referencia).

De igual modo, muchos métodos de transfección son compatibles con la presente invención y se pueden usar en conjunción con las enseñanzas de la presente para proporcionar las composiciones deseadas. Como se analizara, la transfección típicamente se refiere a la introducción de uno o varios polinucleótidos exógenos en una célula huésped usando métodos físicos o químicos. En el arte se conocen muchas técnicas de transfección, que incluyen, por ejemplo, coprecipitación de ADN en fosfato de calcio; DEAE-dextrano; electroporación; transfección mediada por liposomas catiónicos; bombardeo de micropartículas facilitado por partículas de tungsteno; y coprecipitación de ADN en fosfato de estroncio. Además, la electroporación, sonoporación, impalefección, transfección óptica y administración hidrodinámica comprenden algunos métodos de transfección génica de base no química compatibles con la presente invención.

Independientemente de qué metodología se seleccione para efectuar la transformación, se apreciará que los constructos de ácido nucleico de CAR CLDN y los vectores se pueden usar para generar los linfocitos sensibilizados divulgados.

VI. Células huésped

Un vector que comprende un ácido nucleico que codifica el CAR CLDN se puede introducir en cualquier célula huésped que sea capaz de portar y/o

expresar la proteína CAR, incluyendo cualquier célula procariota o eucariota adecuada. Los métodos de transformación compatibles comprenden el uso de sistemas lentivirales y retrovirales, junto con transposones y ARN desnudo. Las células huésped preferidas son aquellas que se pueden cultivar de manera fácil y confiable, tienen tasas de crecimiento razonablemente rápido, tienen sistemas de expresión bien caracterizados, y se pueden transformar o transfectar de manera fácil y eficiente.

Según se usa en la presente, el término “célula huésped” se refiere a cualquier tipo de célula que pueda contener el vector de expresión. La célula huésped puede ser una célula eucariota (por ejemplo, de planta, animal, hongo o alga), una célula procariota (por ejemplo, de bacteria o protozoo), o un vector viral o retroviral. La célula huésped puede ser una célula cultivada o una célula primaria (es decir, aislada directamente del sujeto). La célula huésped también puede ser una célula adherente o una célula suspendida, es decir, una célula que crece en suspensión. Las células huésped adecuadas son conocidas en el arte e incluyen, por ejemplo, células de *E. coli* DH5 α , células de ovario de hámster chino, células VERO de mono, células COS, células HEK293 y similares. A los fines de amplificar o replicar el vector de expresión recombinante, la célula huésped puede ser una célula procariota, por ejemplo, una célula DH5 α . A los fines de producir un CAR recombinante, la célula huésped puede ser una célula de mamífero. La célula huésped preferentemente es una célula humana. La célula huésped puede ser de cualquier tipo celular, se puede originar de cualquier tipo de tejido, y puede estar en cualquier estadio de desarrollo. Por ejemplo, se puede usar una célula recolectada, aislada, purificada o inducida a partir de un fluido corporal, un tejido o un órgano, tal como sangre (sangre periférica, sangre de cordón umbilical, etc.) o médula ósea. Se puede usar una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), una célula inmune [una célula dendrítica, una célula B, una célula madre hematopoyética, un macrófago, un monocito, una célula

NK o una célula hematopoyética (un neutrófilo, un basófilo)], una célula mononuclear de sangre de cordón umbilical, un fibroblasto, un adipocito precursor, un hepatocito, un queratinocito dérmico, una célula madre mesenquimal, una célula madre adiposa, diversas cepas de células cancerígenas, o una célula madre neural. En formas de realización particularmente preferidas, la célula huésped puede ser un linfocito de sangre periférica (PBL), una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC) o una célula asesina natural (NK). Preferentemente, la célula huésped comprende una célula asesina natural (NK). En otras formas de realización preferidas, la célula huésped es una célula T y, en formas de realización seleccionadas, una célula T citotóxica. Los métodos para seleccionar células huésped de mamíferos adecuadas y métodos para la transformación, el cultivo, la amplificación, la selección y la purificación de células son conocidos en el arte. La invención proporciona una célula huésped aislada que expresa secuencias de ácido nucleico que codifican el CAR de CLDN descrito en la presente o composiciones de las mismas. En formas de realización particularmente preferidas, la célula huésped comprende un linfocito que se transforma en un linfocito sensibilizado CLDN tras la expresión de los CAR divulgados. En una forma de realización, la célula huésped es una célula T. La célula T de la invención puede ser cualquier célula T, tal como una célula T cultivada (por ejemplo, una célula T primaria, o una célula T a partir de una línea de célula T cultivada, o una célula T obtenida de un mamífero). Si se obtiene de un mamífero, la célula T se puede obtener de numerosas fuentes, que incluyen, aunque sin limitaciones, sangre, médula ósea, ganglios linfáticos, timo, u otros tejidos o fluidos. Las células T también pueden ser enriquecidas o purificadas. La célula T preferentemente es una célula T humana (por ejemplo, aislada de un humano). La célula T puede estar en cualquier estadio de desarrollo, incluyendo, aunque sin limitaciones, una célula T CD4+/CD8+ doble positiva, una célula T CD4+ ayudante, por ejemplo, células Th1 y Th2, una célula CD8+

(por ejemplo, una célula T citotóxica), una célula infiltrante del tumor, una célula T de memoria, una célula T naïve, y similares. En una forma de realización, la célula T es una célula T CD8+ o una célula T CD4+. Las líneas de células T están disponibles de fuentes comerciales (por ejemplo, de la *American Type Culture Collection* y de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares) e incluyen, por ejemplo, células Jurkat (ATCC TIB-152), células Sup-T1 (ATCC CRL-1942), células RPMI 8402 (DSMZ ACC-290), células Karpas 45 (DSMZ ACC-545) y derivados de ellas.

En otra forma de realización, la célula huésped es una célula asesina natural (NK). Las células NK son un tipo linfocito citotóxico que juega un papel en el sistema inmune innato. Las células NK se definen como grandes linfocitos granulares y constituyen el tercer tipo de células diferenciadas a partir del progenitor linfoide común que también da lugar a los linfocitos B y T (véase, por ejemplo, *Immunobiology*, 5th ed., Janeway *et al.*, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (2001)). Las células NK se diferencian y maduran en médula ósea, ganglios linfáticos, bazo, amígdalas y timo. Luego de la maduración, las células NK ingresan en la circulación como grandes linfocitos con distintivos gránulos citotóxicos. Las células NK son capaces de reconocer y matar algunas células anormales, tales como, por ejemplo, algunas células tumorales y células infectadas con virus, y se cree que son importantes en la defensa inmune innata contra los patógenos intracelulares. Como se describió antes con respecto a las células T, la célula NK puede ser cualquier célula NK, tal como una célula NK cultivada, por ejemplo, una célula NK primaria, o una célula NK proveniente de una línea de célula NK cultivada, o una célula NK obtenida de un mamífero. Si se obtiene de un mamífero, la célula NK se puede obtener de numerosas fuentes, que incluyen, aunque sin limitaciones, sangre, médula ósea, ganglios linfáticos, timo, u otros tejidos o fluidos. Las células NK también pueden ser enriquecidas o purificadas. La célula NK preferentemente es una célula NK humana (por ejemplo, aislada de un humano). Las líneas de células

NK están disponibles de fuentes comerciales (por ejemplo, el *American Type Culture Collection*) e incluyen, por ejemplo, células NK-92 (ATCC CRL-2407), células NK92MI (ATCC CRL-2408) y derivados de ellas.

En la inmunoterapia adoptiva autóloga, los linfocitos circulantes del paciente, o linfocitos infiltrantes del tumor, se aíslan (por ejemplo, por aféresis) *in vitro*, preferentemente activados o estimulados por linfoquinas tales como IL-2, y luego se transducen con ácido nucleicos que codifican un constructo de CAR CLDN. Luego de la transducción, los linfocitos sensibilizados autólogos preferentemente se expanden usando un soporte de citoquinas como se sabe en el arte y se readministran al paciente. Para lograr esto, se administraría a un animal, o un paciente humano, una cantidad inmunológicamente efectiva de linfocitos activados genéticamente modificados para expresar un gen de CAR CLDN según se describe en la presente. En dichos procedimientos autólogos, los linfocitos activados (es decir, linfocitos sensibles a CLDN) son las propias células del paciente que, con la máxima preferencia, fueron aisladas anteriormente de una muestra de sangre o tumor, y activadas y expandidas *in vitro*. En algunos aspectos de la presente invención, los linfocitos T o células NK de un paciente que tiene cáncer se aíslan y transducen con el polinucleótido SCT1-h27.xx (Ejemplo 9 a continuación) de modo que el CAR CLDN se exprese en la superficie celular de la célula T o célula NK. Las células modificadas se readministran luego al paciente para apuntar contra las células tumorales y destruirlas (véase en general la FIG. 7).

Otros aspectos preferidos de la invención comprenden trasplantes alogénicos de linfocitos sensibles a CLDN. En dichas formas de realización, los CAR de CLDN divulgados se pueden introducir (por ejemplo, por transducción) en linfocitos obtenidos de una fuente distinta del sujeto a ser tratado. Algunos aspectos de la presente invención comprenden el uso de linfocitos alogénicos obtenidos de un donante que se corresponde inmunológicamente con el receptor para reducir la chance de rechazo. En otros aspectos, los CAR

divulgados se introducen en linfocitos alogénicos “fuera de la plataforma” (véase PMID: 26183927, que se incorpora a la presente por referencia) que han sido modificados para facilitar el trasplante y generar la respuesta inmune apropiada tras el contacto con la célula blanco. Se apreciará que el uso de dichas preparaciones prefabricadas de linfocitos alogénicos puede proporcionar varias ventajas en términos de la preparación de los linfocitos sensibilizados farmacéuticamente activos y la reducción de las chances de un rechazo del paciente.

También se apreciará que los linfocitos sensibles a CLDN se pueden expandir *in vitro* antes o después de la transformación con el CAR CLDN. Los métodos para expandir las poblaciones celulares seleccionadas son bien conocidos en el arte, y hay disponibles varios kits comerciales compatibles con la presente invención. En tal sentido, las células T y/o las células NK se pueden expandir *in vitro* para proporcionar opciones posológicas más robustas. Por ejemplo, de acuerdo con la presente invención, las células NK pueden preferentemente expandirse por exposición a células que carecen o que expresan pobremente moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor I y/o II, y que han sido genéticamente modificadas para expresar el ligando unido a membrana IL-15 y 4-1BB (CD137L). Dichas líneas celulares incluyen, aunque no necesariamente se limitan a ellas, K562 (ATCC, CCL 243) y la línea celular de tumor de Wilms HFWT, la línea celular de tumor de endometrio uterino HHUA, la línea celular de melanoma HMV-II, la línea celular de hepatoblastoma HuH-6, las líneas celulares de carcinoma de pulmón de células pequeñas Lu-130 y Lu-134-A, las líneas celulares de neuroblastoma NB 19 y N1369, la línea celular de carcinoma embrionario de testículos NEC 14, la línea celular de carcinoma de cuello de útero TCO-2, y la línea celular de neuroblastoma con metástasis en médula ósea TNB 1. Preferentemente, la línea celular usada carece de o expresa pobremente moléculas del MHC I y II, tales como las líneas celulares K562 y HFWT. Las técnicas similares permiten la expansión de poblaciones de

células T seleccionadas. En tal sentido, algunos procesos emplean anti-CD3 más células alimentadoras autólogas o alogénicas y altas dosis de IL-2. Otros procesos usan IL-7, IL-15, IL-21 o combinaciones de ellos para la expansión y estimulación de células T. Se apreciará que cada uno de los mencionados procesos, junto con cualquier proceso que proporcione el número deseado de linfocitos sensibles a CLDN, es compatible con la presente invención.

VII. Formulación y administración de linfocitos sensibles a CLDN

Como se establece en la presente, los linfocitos sensibles a CLDN se pueden expandir *in vitro* para usar en la inmunoterapia celular adoptiva, los que comprenden linfocitos autólogos o alogénicos. En tal sentido, las composiciones y los métodos de esta invención se pueden usar para generar una población de linfocitos sensibilizados que preferentemente entregan señales primarias y coestimuladoras para usar en el tratamiento de cáncer y, a modo de ejemplo, el tratamiento del cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, melanoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, carcinoma de células renales, cáncer de ovario, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, leucemia y linfoma. Las composiciones y los métodos descritos en la presente invención se pueden usar en conjunción con otros tipos de terapia para el cáncer, tales como quimioterapia, cirugía, radiación, terapia génica y demás.

Los linfocitos sensibles a CLDN o las células huésped preferentemente se administran a un sujeto en forma de una composición farmacéutica que comprende uno o varios portadores farmacéuticamente aceptables. En formas de realización particularmente preferidas, las composiciones farmacéuticas divulgadas comprenden una población de células T o células NK (autólogas o alogénicas) que expresan el CAR CLDN. Además, dichas composiciones farmacéuticas de células huésped de la invención pueden comprender otros agentes o fármacos farmacéuticamente activos, tales como agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, asparaginasa, busulfano, carboplatino,

cisplatino, daunorrubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc.) o terapias adyuvantes que estimulan adicionalmente la respuesta inmune. En una forma de realización preferida, la composición farmacéutica comprende células T o células NK aisladas que expresan los CAR de CLDN divulgados, y más preferentemente una población de células T o células NK sensibilizadas que expresan los CAR de CLDN divulgados. Asimismo, dichas composiciones pueden comprender búferes, conservantes, excipientes, etc. farmacéuticamente aceptables, como es bien sabido en el arte.

Alternativamente, las secuencias de ácido nucleico que codifican los CAR CLDN, o los vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR CLDN, se pueden formular en una composición farmacéutica y usar para transducir linfocitos *ex vivo* o administrar directamente al paciente. En dichas formas de realización, se prefieren los sistemas de vectores que comprenden células huésped de vector viral (por ejemplo, sistemas lentiviral o sistemas retrovirales) o sobres virales artificiales dirigidos. Dichos vectores permiten la generación *in vivo* de linfocitos sensibles a CLDN que luego pueden inducir la respuesta inmune antitumoral deseada.

En cualquier caso, las células huésped de CAR CLDN de la invención y cualquier co-reactivo se pueden formular de distintas maneras usando técnicas reconocidas en el arte. En algunas formas de realización, las composiciones terapéuticas de la invención se pueden administrar puras o con un mínimo de componentes adicionales, mientras que otras pueden formularse opcionalmente para contener portadores farmacéuticamente aceptables adecuados. Según se usa en la presente, los “portadores farmacéuticamente aceptables” comprenden excipientes, vehículos, adyuvantes y diluyentes que son bien conocidos en el arte y pueden obtenerse de fuentes comerciales para usar en las preparaciones farmacéuticas (véase, por ejemplo, Gennaro (2003) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and*

Comparisons: Drugfacts Plus, 20th ed., Mack Publishing; Ansel *et al.* (2004) *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7th ed., Lippencott Williams y Wilkins; Kibbe *et al.* (2000) *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3rd ed., Pharmaceutical Press).

Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados típicamente comprenden sustancias que son relativamente inertes y pueden facilitar la administración del linfocito sensibilizado o la célula huésped, o pueden ayudar en el procesamiento de los mismos en preparaciones que son farmacéuticamente optimizadas para su administración en el sitio de acción. Dichos portadores farmacéuticamente aceptables incluyen agentes que pueden alterar la forma, consistencia, viscosidad, pH, tonicidad, estabilidad, osmolaridad, farmacocinética, agregación de proteínas o solubilidad de la formulación, e incluyen agentes de búfer, agentes humectantes, agentes emulsionantes, diluyentes, agentes encapsulantes y mejoradores de la penetración dérmica. Ciertos ejemplos no limitativos de portadores incluyen solución salina, solución salina abuferada, dextrosa, arginina, sacarosa, agua, glicerol, etanol, sorbitol, dextrano, carboximetil celulosa sódica y combinaciones de ellos. Los linfocitos sensibilizados para administración sistémica se pueden formular para su administración enteral, parenteral o tópica. De hecho, se pueden usar los tres tipos de formulación simultáneamente para lograr la administración sistémica del ingrediente activo. Los excipientes, así como las formulaciones para la administración parenteral y no parenteral del fármaco, son bien conocidos en el arte.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral de linfocitos sensibles a CLDN (por ejemplo, por inyección) incluyen líquidos acuosos o no acuosos, isotónicos, libres de pirógenos, estériles (por ejemplo, soluciones, suspensiones), en los cuales el ingrediente activo se disuelve, suspende o de otro modo se proporciona (por ejemplo, en un liposoma u otra micropartícula). Dichos líquidos pueden contener además otros portadores farmacéuticamente

aceptables, tales como antioxidantes, amortiguadores, conservantes, estabilizantes, bacteriostatos, agentes de suspensión, agentes espesantes y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre (u otros fluido corporal relevante) del receptor en cuestión. Los ejemplos de excipientes incluyen, por ejemplo, agua, alcoholes, polioles, glicerol, aceites vegetales, y similares. Los ejemplos de portadores isotónicos farmacéuticamente aceptables adecuados para usar en dichas formulaciones incluyen cloruro de sodio para uso inyectable, solución de Ringer o solución de lactato de Ringer para uso inyectable.

Los métodos para introducir componentes celulares también son conocidos en el arte e incluyen procedimientos tales como aquellos ejemplificados en U.S.P Nros. 4.844.893 y 4.690.915. La cantidad de linfocitos sensibles a CLDN (por ejemplo, células T o células NK) usada puede variar entre los usos *in vitro* e *in vivo*, así como con la cantidad y el tipo de células blanco. La cantidad administrada también varía según la afección del paciente y debe ser determinada por el médico luego de considerar todos los factores correspondientes.

El régimen posológico particular de linfocitos sensibles a CLDN, es decir, dosis, hora y repetición, dependerá del individuo particular, así como de consideraciones empíricas tales como la farmacocinética (por ejemplo, vida media, tasa de eliminación, etc.). Por ejemplo, los individuos pueden recibir dosis incrementales de linfocitos sensibilizados producidos según se describe en la presente. En formas de realización seleccionadas, la dosis se puede aumentar o disminuir gradualmente, o atenuar, sobre la base los efectos secundarios o la toxicidad determinados empíricamente u observados, respectivamente. La determinación de la frecuencia de administración puede estar a cargo de personas con experiencia en el arte, tales como el médico responsable, sobre la base de consideraciones de la afección y severidad de la afección que se está tratando, la edad y el estado de salud general del sujeto

que está siendo tratado, y similares. La frecuencia de administración se puede ajustar en el transcurso de la terapia según la evaluación de la eficacia de la composición seleccionada y el régimen de dosis. Dicha evaluación se puede realizar sobre la base de marcadores de la enfermedad, trastorno o afección específica. En formas de realización en las cuales el individuo tiene cáncer, éstos incluyen mediciones directas del tamaño tumoral por palpación u observación visual; mediciones indirectas del tamaño tumoral por radiografía u otras técnicas por imágenes; una mejoría, evaluada por biopsia tumoral directa y examen microscópico de una muestra tumoral; medición de un marcador tumoral indirecto (por ejemplo, PSMA) o un antígeno CLDN identificado en la presente; reducción del número de células proliferativas o tumorigénicas, mantenimiento de la reducción de dichas células neoplásicas; reducción de la proliferación de células neoplásicas; o demora en el desarrollo de metástasis.

En vista de la presente divulgación, el CAR CLDN se puede administrar siguiendo un cronograma específico. En general, se administra una dosis efectiva de los linfocitos sensibilizados a un sujeto una o varias veces. Más particularmente, se administra una dosis efectiva del CAR CLDN al sujeto una vez por mes, más de una vez por mes, o menos de una vez por mes. En ciertas formas de realización, la dosis efectiva de los linfocitos sensibles a CLDN se puede administrar múltiples veces, incluyendo durante períodos de al menos un mes, al menos seis meses, al menos un año, al menos dos años o un período de varios años. En incluso otras formas de realización, varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7), varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) o varios meses (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) o incluso un año o varios años pueden pasar entre la administración de los linfocitos sensibles a CLDN.

En ciertas formas de realización preferidas, el transcurso del tratamiento que involucra CAR CLDN comprende múltiples dosis de los linfocitos sensibilizados seleccionados durante un período de semanas o meses. Más específicamente, los linfocitos sensibles a CLDN de la presente invención se

pueden administrar una vez por día, cada dos días, cada cuatro días, cada semana, cada diez días, cada dos semanas, cada tres semanas, cada mes, cada seis semanas, cada dos meses, cada diez semanas o cada tres meses. En tal sentido, se apreciará que las dosis se pueden alterar, o el intervalo se puede ajustar sobre la base de la respuesta del paciente y las prácticas clínicas.

Una cantidad típica de células huésped administrada a un mamífero (por ejemplo, un humano) puede estar, por ejemplo, en el rango de un millón a 100 billones de células; sin embargo, las cantidades por debajo o por encima de este rango ilustrativo se encuentran dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, la dosis diaria de las células huésped de la invención puede ser de aproximadamente 1 millón hasta aproximadamente 50 billones de células (por ejemplo, aproximadamente de 5 millones de células, aproximadamente 25 millones de células, aproximadamente 500 millones de células, aproximadamente 1 billones de células, aproximadamente 5 billones de células, aproximadamente 20 billones de células, aproximadamente 30 billones de células, aproximadamente 40 billones de células, o un rango definido por cualesquiera dos de los valores anteriores), preferentemente aproximadamente 10 millones hasta aproximadamente 100 billones de células (por ejemplo, aproximadamente 20 millones de células, aproximadamente 30 millones de células, aproximadamente 40 millones de células, aproximadamente 60 millones de células, aproximadamente 70 millones de células, aproximadamente 80 millones de células, aproximadamente 90 millones de células, aproximadamente 10 billones de células, aproximadamente 25 billones de células, aproximadamente 50 billones de células, aproximadamente 75 billones de células, aproximadamente 90 billones de células, o un rango definido por cualesquiera dos de los valores anteriores), más preferentemente aproximadamente 100 millones de células hasta aproximadamente 50 billones de células (por ejemplo, aproximadamente 120 millones de células,

aproximadamente 250 millones de células, aproximadamente 350 millones de células, aproximadamente 450 millones de células, aproximadamente 650 millones de células, aproximadamente 800 millones de células, aproximadamente 900 millones de células, aproximadamente 3 billones de células, aproximadamente 30 billones de células, aproximadamente 45 billones de células, o un rango definido por cualesquiera dos de los valores anteriores). En formas de realización preferidas, aproximadamente 0,5 billones, 1,0 billones, 1,5 billones, 2 billones, 2,5 billones, 3 billones, 3,5 billones, 4 billones, 4,5 billones, 5 billones, 5,5 billones, 6 billones, 6,5 billones, 7 billones, 7,5 billones, 8 billones, 8,5 billones, 9 billones, 9,5 billones o 10 billones de células se administran al paciente en una o varias dosis.

La eficacia terapéutica o profiláctica se puede monitorear por evaluación periódica de los pacientes tratados. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se repite hasta que se produce la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosis pueden ser útiles y se encuentran dentro del alcance de la invención. La dosis deseada se puede administrar por bolo simple de la composición, en múltiples bolos de la composición, o por infusión continua de la composición.

Como se analizó antes, las composiciones que comprenden las células huésped sensibilizadas que expresan el CAR CLDN se pueden administrar a un mamífero usando técnicas estándar de administración, que incluyen intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular o intranasal. La composición preferentemente es adecuada para la administración parenteral. El término "parenteral", según se usa en la presente, incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal e intraperitoneal. Más preferentemente, la composición se administra a un mamífero usando la vía sistémica periférica por inyección intravenosa, intraperitoneal o subcutánea.

Más aún, las células huésped que expresan la secuencia de ácido nucleico de CAR CLDN, o un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica CAR, se pueden administrar con uno o varios agentes terapéuticos adicionales, que pueden coadministrarse al mamífero. Por “coadministrar” se entiende administrar uno o varios agentes terapéuticos adicionales y la composición que comprende las células huésped de la invención o el vector de la invención suficientemente cerca en el tiempo de modo que el CAR CLDN pueda mejorar el efecto de uno o varios agentes terapéuticos adicionales, o viceversa. En tal sentido, la composición que comprende los linfocitos sensibilizados se puede administrar primero, y el uno o varios agentes terapéuticos adicionales se puede administrar en segundo lugar, o viceversa. Alternativamente, la composición que comprende los linfocitos sensibles a CLDN y el uno o varios agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar simultáneamente.

En formas de realización preferidas seleccionadas, los linfocitos sensibles a CLDN se administran junto con terapias linfotóxicas para aumentar la disponibilidad de citoquinas homeostáticas (por ejemplo, IL-7, IL-15, etc.) para respaldar la expansión de células T. En dichos protocolos, la terapia linfotóxica preferentemente se lleva a cabo previo a la administración de los linfocitos sensibilizados. Más específicamente, se cree que un régimen preparatorio de linfodepleción puede mejorar la eficacia de la terapia celular adoptiva al reducir los linfocitos endógenos, lo cual conduce a la acumulación de citoquinas homeostáticas que soportan la expansión y persistencia de los linfocitos sensibilizados administrados. Más aún, dichos tratamientos preparatorios pueden conducir a una reducción transitoria del número y la frecuencia de Treg, lo cual disminuye la supresión de linfocitos, y una inducción de daño intestinal que podría conducir a la liberación sistémica de subproductos bacterianos (por ejemplo, lipopolisacáridos) que activan el sistema inmune innato. Tomados en conjunto, dichos mecanismos pueden mejorar

sustancialmente la receptividad del entorno inmune para los linfocitos sensibles a CLDN trasplantados, lo cual promueve la expansión y persistencia de los mismos.

VIII. Indicaciones

La presente invención proporciona el uso de linfocitos sensibles a CLDN de la invención para el tratamiento, el mantenimiento y/o la profilaxis de diversos trastornos, que incluyen trastornos neoplásicos, inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos asociados con CLDN. Los blancos preferidos para el tratamiento son afecciones neoplásicas que comprenden tumores sólidos y malignidades hematológicas. En ciertas formas de realización, los tratamientos CAR CLDN de la invención se usan para inhibir, reducir o eliminar tumores o células tumorigénicas que expresan CLDN. Preferentemente, el “sujeto” o “paciente” a tratar es un humano aunque, según se usa en la presente, los términos comprenden expresamente cualquier especie de mamífero.

Las afecciones neoplásicas sujetas al tratamiento de acuerdo con la presente invención pueden ser benignas o malignas; tumores sólidos u otras neoplasias de la sangre; y se pueden seleccionar del grupo que incluye, aunque sin limitaciones: tumores de las glándulas suprarrenales, cáncer asociado con el SIDA, sarcoma alveolar de partes blandas, tumores astrocíticos, tumores de ganglios autonómicos, cáncer de vejiga (carcinoma de células escamosas y carcinoma de células transicionales), trastornos blastocoélicos, cáncer óseo (adamantinoma, quistes óseos aneurismales, osteocondroma, osteosarcoma), cáncer de cerebro y médula espinal, tumores metastásicos de cerebro, cáncer de mama incluido cáncer de mama triple negativo, tumores de cuerpo carotideo, cáncer cervical, condrosarcoma, cordoma, carcinoma de células renales cromóforo, carcinoma de células claras, cáncer de colon, cáncer colorrectal, histiocitomas fibrosis benignos cutáneos, tumores de células redondas pequeñas desmoplásicos, ependimomas, trastornos epiteliales,

tumores de Ewing, condrosarcoma mixoide extraesquelético, fibrogénesis imperfecta ósea, displasia fibrosa del hueso, cáncer de vesícula biliar y vías biliares, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, enfermedad trofoblástica gestacional, tumores de células germinales, trastornos glandulares, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hipotalámico, cáncer intestinal, tumores de células islotas, sarcoma de Kaposi, cáncer renal (nefroblastoma, carcinoma de células renales papilares), leucemias, lipoma/tumores lipomatosos benignos, liposarcoma/tumores lipomatosos malignos, cáncer hepático (hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular), linfomas, cáncer de pulmón (carcinoma de células pequeñas, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes, etc.), trastornos macrofágicos, meduloblastoma, melanoma, meningiomas, neoplasias endocrinas múltiples, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, neuroblastoma, tumores neuroendocrinos, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, carcinomas tiroideos papilares, tumores paratiroides, cáncer pediátrico, tumores de vaina de nervios periféricos, feocromocitoma, tumores de pituitaria, cáncer de próstata, melanoma uveal posterior, trastornos hematológicos raros, cáncer renal metastásico, tumor rabdoide, rhabdomyosarcoma, sarcomas, cáncer de piel, sarcomas de tejidos blandos, cáncer de células escamosas, cáncer de estómago, trastornos estromales, sarcoma sinovial, cáncer testicular, carcinoma de timo, timoma, cáncer de tiroides metastásico y cáncer uterino (carcinoma de cuello del útero, carcinoma endometrial y leiomioma).

En formas de realización particularmente preferidas, el sujeto sufre de cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer gástrico. En las formas de realización preferidas, el sujeto es refractario en cuanto a cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer gástrico.

En otras formas de realización preferidas, los tratamientos de CAR CLDN

divulgados son especialmente efectivos para tratar el cáncer de pulmón, incluidos los siguientes subtipos: cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas escamosas o cáncer de pulmón de células pequeñas escamosas). En formas de realización seleccionadas, los linfocitos sensibilizados CLDN se pueden administrar a los pacientes que exhiben enfermedad en estadio limitado o enfermedad en estadio extensivo. En otras formas de realización preferidas, las composiciones celulares divulgadas se administran a pacientes refractarios (es decir, aquellos cuya enfermedad recurre durante o poco después de completar un régimen de terapia inicial); pacientes sensibles (es decir, aquellos cuya recaída es mayor a 2–3 meses después de la terapia primaria); o pacientes que exhiben resistencia a un agente basado en platino (por ejemplo, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino) y/o un taxano (por ejemplo, docetaxel, paclitaxel, larotaxel o cabazitaxel).

En otra forma de realización particularmente preferida, los tratamientos de CAR CLDN divulgados son efectivos para tratar el cáncer de ovario, incluyendo carcinoma seroso de ovario y carcinoma seroso papilar de ovario.

En otra forma de realización preferida, los tratamientos de CAR CLDN de la presente invención se pueden usar en la terapia de mantenimiento para reducir o eliminar la chance de recurrencia del tumor luego de la presentación inicial de la enfermedad. Preferentemente, el trastorno habrá sido tratado y la masa tumoral inicial eliminada, reducida o de lo contrario mejorada de modo que el paciente sea asintomático o esté en remisión. En dicho momento, el sujeto puede recibir cantidades farmacéuticamente efectivas de los tratamientos de CAR CLDN divulgados una o varias veces, aunque exista poca o ninguna indicación de enfermedad usando los procedimientos de diagnóstico estándar. En algunas formas de realización, los moduladores se administrarán según un cronograma regular durante un período de tiempo, tal como semanalmente, cada dos semanas, mensualmente, cada seis semanas, cada

dos meses, cada tres meses cada seis meses o anualmente. Dadas las enseñanzas de la presente, el especialista en el arte puede determinar fácilmente las dosis y regímenes posológicos favorables para reducir el potencial de recurrencia de la enfermedad. Más aún, dichos tratamientos se podrían continuar durante un período de semanas, meses, años o incluso indefinidamente, dependiendo de la respuesta del paciente y los parámetros clínicos y de diagnóstico.

En incluso otra forma de realización preferida, los tratamientos de CAR CLDN de la presente invención se pueden usar en forma profiláctica o como terapia adyuvante para prevenir o reducir la posibilidad de metástasis tumoral luego de un procedimiento de resección. Según se usa en la presente divulgación, un “procedimiento de resección” se define ampliamente y significa cualquier procedimiento, técnica o método que elimina, reduce, trata o mejora un tumor o la proliferación del tumor. Los ejemplos de procedimientos de resección incluyen, aunque no a modo de limitación, cirugía, tratamientos por radiación (es decir, emisión de rayos), quimioterapia, inmunoterapia o ablación. En momentos adecuados, fácilmente determinados por el especialista en el arte en vista de la presente divulgación, los tratamientos de CAR CLDN divulgados se pueden administrar como los sugieren los procedimientos clínicos, de diagnóstico o teragnóstico para reducir la metástasis tumoral. Los linfocitos sensibles a CLDN se pueden administrar una o varias veces en dosis farmacéuticamente efectivas, según se determina usando técnicas estándar. Preferentemente, el régimen posológico estará acompañado por técnicas apropiadas de diagnóstico o monitoreo que permitirán modificarlo.

Incluso otra forma de realización de la invención comprende administrar los tratamientos de CAR CLDN divulgados a sujetos que son asintomáticos pero están en riesgo de desarrollar un trastorno proliferativo. Es decir, los tratamientos de CAR CLDN de la presente invención se pueden usar en un sentido verdaderamente preventivo y administrarse a pacientes que han sido

examinados o evaluados y presentan uno o varios factores de riesgo observados (por ejemplo, indicaciones genómicas, antecedentes familiares, resultados de análisis *in vivo* o *in vitro*, etc.) pero que no han desarrollado neoplasia. En tales casos, el especialista en el arte será capaz de determinar un régimen posológico efectivo a través de la observación empírica o a través de prácticas clínicas aceptadas.

IX. Terapias de combinación

Como se analizó previamente, se apreciará que los tratamientos de CAR CLDN descritos en la presente se pueden usar en combinación con otros tratamientos oncológicos clínicos. En general, los tratamientos de la presente invención se pueden usar con un resto terapéutico o un fármaco tal como un agente anticancerígeno, incluyendo, aunque sin limitaciones, agentes citotóxicos, agentes citostáticos, agentes anti-angiogénicos, agentes de resección, agentes quimioterapéuticos, agentes radioterapéuticos, agentes anticancerígenos dirigidos, modificadores de la respuesta biológica, vacunas contra el cáncer, citoquinas, terapias hormonales, agentes anti-metástasis y agentes inmunoterapéuticos.

Las terapias de combinación pueden ser útiles para prevenir o tratar el cáncer, y para prevenir la metástasis o recurrencia del cáncer. "Terapia de combinación", según se usa en la presente, significa la administración de una combinación que comprende al menos un tratamiento de CAR CLDN y al menos un resto terapéutico (por ejemplo, un agente anti-cancerígeno), en donde la combinación preferentemente tiene sinergia terapéutica o mejora los efectos terapéuticos medibles en el tratamiento de cáncer respecto de (i) el tratamiento de CAR CLDN usado solo, o (ii) el resto terapéutico usado solo, o (iii) el uso del resto terapéutico en combinación con otro resto terapéutico sin la adición del tratamiento de CAR CLDN. El término "sinergia terapéutica", según se usa en la presente, significa la combinación de un tratamiento de CAR CLDN y uno o varios restos terapéuticos que tiene un efecto terapéutico mayor

que el efecto aditivo de la combinación del tratamiento de CAR CLDN y el uno o varios restos terapéuticos.

Los resultados deseados de las combinaciones divulgadas se cuantifican por comparación con una medición de control o basal. Según se usa en la presente, los términos relativos tales como "mejorar", "aumentar" o "reducir" indican valores respecto de un control, tal como una medición en el mismo individuo previa al inicio del tratamiento descrito en la presente, o una medición en un individuo de control (o en múltiples individuos de control) en ausencia de los tratamientos de CAR CLDN descritos en la presente, pero en presencia de otros restos terapéuticos, tales como el tratamiento estándar de referencia. Un individuo de control representativo es un individuo afligido por la misma forma de cáncer que el individuo que está siendo tratado, que es de aproximadamente la misma edad que el individuo que está siendo tratado (para asegurar que los estadios de la enfermedad en el individuo tratado y en el individuos de control sean comparables).

Los cambios o las mejoras en la respuesta a la terapia por lo general son estadísticamente significativas. Según se usa en la presente, el término "significación" o "significativo/a" se refiere a un análisis estadístico de la probabilidad de que exista una asociación no aleatoria entre dos o más entidades. Para determinar si una relación es o no "significativa" o tiene o no "significación", se puede calcular un "valor p". Los valores p que caen por debajo de un valor de corte definido por el usuario se consideran significativos. Un valor p menor o igual a 0,1, menor a 0,05, menor a 0,01, menor a 0,005 o menor a 0,001 se puede considerar significativo.

Un efecto terapéutico sinérgico puede ser un efecto al menos aproximadamente dos veces mayor que el efecto terapéutico generado por un solo resto terapéutico o tratamiento de CAR CLDN, o la suma de los efectos terapéuticos generados por el tratamiento de CAR CLDN o el resto terapéutico solo de una combinación dada, o al menos aproximadamente cinco veces

mayor, o al menos aproximadamente diez veces mayor, o al menos aproximadamente veinte veces mayor, o al menos aproximadamente cincuenta veces mayor o al menos aproximadamente cien veces mayor. Un efecto terapéutico sinérgico también puede observarse como un aumento del efecto terapéutico de al menos 10% en comparación con el efecto terapéutico generado por un solo resto terapéutico o tratamiento de CAR CLDN o la suma de los efectos terapéuticos generados por el tratamiento de CAR CLDN o el resto terapéutico solo de una combinación dada, o al menos 20%, o al menos 30%, o al menos 40%, o al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 100%, o más. Un efecto sinérgico también es un efecto que permite una dosificación reducida de los agentes terapéuticos cuando se usan en combinación.

Al poner en práctica la terapia de combinación, el tratamiento de CAR CLDN y el resto terapéutico se pueden administrar al sujeto simultáneamente, en una única composición, o en forma de dos o más composiciones distintas usando la misma vía de administración o vías diferentes. Alternativamente, el tratamiento de CAR CLDN puede preceder o seguir al resto terapéutico en, por ejemplo, intervalos que van desde minutos hasta semanas. En una forma de realización, tanto el resto terapéutico como el CAR se administran dentro de aproximadamente 5 minutos hasta aproximadamente dos semanas uno del otro. En incluso otras formas de realización, varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7), varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) o varios meses (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) pueden pasar entre la administración del CAR y el resto terapéutico.

La terapia de combinación se puede administrar hasta que la afección sea tratada, paliada o curada en distintos cronogramas, tales como una vez, dos veces o tres veces por día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada seis meses, o se puede administrar continuamente. El CAR y el resto terapéutico se pueden administrar

en días o semanas alternados; o se puede administrar una secuencia de tratamiento de CAR CLDN, seguida por uno o varios tratamientos con el resto terapéutico adicional. En una forma de realización, se administra un CAR CLDN en combinación con uno o varios restos terapéuticos durante ciclos de tratamiento cortos. En otras formas de realización, el tratamiento de combinación se administra durante ciclos de tratamiento largos. La terapia de combinación se puede administrar por cualquier vía.

En algunas formas de realización, el tratamiento de CAR CLDN (es decir, la administración de linfocitos sensibles a CLDN) se puede usar en combinación con diversos tratamientos para el cáncer de primera línea. En una forma de realización, la terapia de combinación comprende el uso de un tratamiento de CAR CLDN y un agente citotóxico tal como ifosfamida, mitomicina C, vindesina, vinblastina, etopósido, irinotecán, gemcitabina, taxanos, vinorelbina, metotrexato y pemetrexed) y opcionalmente uno o varios otros restos terapéuticos.

PD-1, junto con su ligando PD-L1, es otro regulador negativo de la respuesta antitumoral de linfocitos T. En una forma de realización, la terapia de combinación puede comprender el tratamiento de CAR CLDN junto con un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, lambrolizumab, nivolumab) y opcionalmente uno o varios restos terapéuticos adicionales. En otra forma de realización, la terapia de combinación puede comprender el tratamiento de CAR CLDN junto con un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, MPDL3280A, MEDI4736) y opcionalmente uno o varios restos terapéuticos adicionales. En incluso otra forma de realización, la terapia de combinación puede comprender un tratamiento de CAR CLDN junto con un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, pembrolizumab) administrado a pacientes que continúan progresando luego de los tratamientos con otras terapias de combinación anti-PD-1 y/o dirigidas a BRAF (por ejemplo, ipilimumab y vemurafenib o dabrafenib).

En otra forma de realización, la terapia de combinación comprende el uso

de un tratamiento de CAR CLDN y un fármaco basado en platino (por ejemplo, carboplatino o cisplatino) y opcionalmente uno o varios restos terapéuticos adicionales (por ejemplo, vinorelbina; gemcitabina; un taxano tal como, por ejemplo, docetaxel o paclitaxel; irinotecán; o pemetrexed).

En una forma de realización, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer BR-ERPR, BR-ER o BR-PR, la terapia de combinación comprende el uso de un tratamiento de CAR CLDN y uno o varios restos terapéuticos descritos como "terapia hormonal". La "terapia hormonal", según se usa en la presente, se refiere a, por ejemplo, tamoxifeno; gonadotropina u hormona liberadora luteinizante (GnRH o LHRH); everolimus y exemestano; toremifeno; o inhibidores de aromatasa (por ejemplo, anastrozol, letrozol, exemestano o fulvestrant).

En otra forma de realización, por ejemplo, en el tratamiento de BR-HER2, la terapia de combinación comprende el uso de un tratamiento de CAR CLDN y trastuzumab o ado-trastuzumab emtansina y opcionalmente uno o varios restos terapéuticos adicionales (por ejemplo, pertuzumab y/o docetaxel).

En algunas formas de realización, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer de mama metastásico, la terapia de combinación comprende el uso de un tratamiento de CAR CLDN y un taxano (por ejemplo, docetaxel o paclitaxel) y opcionalmente un resto terapéutico adicional, por ejemplo, una antraciclina (por ejemplo, doxorubicina o epirubicina) y/o eribulina.

En otra forma de realización, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer de mama metastásico o recurrente o el cáncer de mama con mutación BRCA, la terapia de combinación comprende el uso de un tratamiento de CAR CLDN y megestrol y opcionalmente un resto terapéutico adicional.

En otras formas de realización, por ejemplo, en el tratamiento de BR-TNBC, la terapia de combinación comprende el uso de un tratamiento de CAR CLDN y un inhibidor de poli ADP ribosa polimerasa (PARP) (por ejemplo, BMN-673, olaparib, rucaparib y veliparib) y opcionalmente un resto terapéutico

adicional.

En otra forma de realización, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer de mama, la terapia de combinación comprende el uso de un tratamiento de CAR CLDN y ciclofosfamida y opcionalmente un resto terapéutico adicional (por ejemplo, doxorubicina, un taxano, epirubicina, 5-FU y/o metotrexato).

En otra forma de realización, la terapia de combinación para el tratamiento del NSCLC EGFR-positivo comprende el uso de un tratamiento de CAR CLDN y afatinib, y opcionalmente uno o varios restos terapéuticos adicionales (por ejemplo, erlotinib y/o bevacizumab).

En otra forma de realización, la terapia de combinación para el tratamiento del NSCLC EGFR-positivo comprende el uso de un tratamiento de CAR CLDN y erlotinib, y opcionalmente uno o varios restos terapéuticos adicionales (por ejemplo, bevacizumab).

En otra forma de realización, la terapia de combinación para el tratamiento del NSCLC ALK-positivo comprende el uso de un tratamiento de CAR CLDN y ceritinib, y opcionalmente uno o varios restos terapéuticos adicionales.

En otra forma de realización, la terapia de combinación para el tratamiento del NSCLC ALK-positivo comprende el uso de un tratamiento de CAR CLDN y crizotinib, y opcionalmente uno o varios restos terapéuticos adicionales.

En otra forma de realización, la terapia de combinación comprende el uso de un tratamiento de CAR CLDN y bevacizumab, y opcionalmente uno o varios restos terapéuticos adicionales (por ejemplo, un taxano tal como, por ejemplo, docetaxel o paclitaxel; y/o un análogo de platino).

En otra forma de realización, la terapia de combinación comprende el uso de un tratamiento de CAR CLDN y bevacizumab, y opcionalmente uno o varios restos terapéuticos adicionales (por ejemplo, gemcitabina y/o un análogo de platino).

En una forma de realización, la terapia de combinación comprende el uso de un tratamiento de CAR CLDN y un análogo de fármaco basado en platino (por ejemplo, carboplatino o cisplatino), y opcionalmente uno o varios restos terapéuticos adicionales (por ejemplo, un taxano tal como, por ejemplo, docetaxel y paclitaxel).

En una forma de realización, la terapia de combinación comprende el uso de un tratamiento de CAR CLDN y un análogo de fármaco basado en platino (por ejemplo, carboplatino o cisplatino), y opcionalmente uno o varios restos terapéuticos adicionales (por ejemplo, un taxano tal como, por ejemplo, docetaxel y paclitaxel y/o gemcitabina y/o doxorubicina).

En una forma de realización particular, la terapia de combinación para el tratamiento de tumores resistentes al platino comprende el uso de un tratamiento de CAR CLDN y doxorubicina y/o etopósido y/o gemcitabina y/o vinorelbina y/o ifosfamida y/o 5-fluorouracilo modulado por leucovorina y/o bevacizumab y/o tamoxifeno; y opcionalmente uno o varios restos terapéuticos adicionales.

En otra forma de realización, la terapia de combinación comprende el uso de un tratamiento de CAR CLDN y un inhibidor de PARP, y opcionalmente uno o varios restos terapéuticos adicionales.

En otra forma de realización, la terapia de combinación comprende el uso de un tratamiento de CAR CLDN y bevacizumab, y opcionalmente ciclofosfamida.

La terapia de combinación puede comprender un tratamiento de CAR CLDN y un resto quimioterapéutico que es efectivo en un tumor que comprende un gen o proteína mutado o aberrantemente expresado (por ejemplo, BRCA1). Más generalmente, los tratamientos de CAR CLDN de la presente invención se pueden usar en combinación con un número de agentes anticancerígenos. El término “agente anticancerígeno” o “agente quimioterapéutico”, según se usa en la presente, es un subconjunto de “restos terapéuticos”, que a su vez es un

subconjunto de los agentes descritos como “restos farmacéuticamente activos”. Más particularmente, “agente anticancerígeno” significa cualquier agente que se puede usar para tratar un trastorno proliferativo de las células, tal como el cáncer, e incluye, sin limitaciones, agentes citotóxicos, agentes citostáticos, radioterapia y agentes anti-angiogénicos, agentes de resección, agentes quimioterapéuticos, agentes radioterapéuticos, agentes anticancerígenos dirigidos, modificadores de la respuesta biológica, anticuerpos terapéuticos, vacunas contra el cáncer, citoquinas, terapias hormonales, agentes anti-metástasis y agentes inmunoterapéuticos. Se apreciará que, en formas de realización seleccionadas como se analizó antes, dichos agentes anticancerígenos pueden comprender conjugados de anticuerpo-fármaco y se pueden asociar con anticuerpos previo a su administración.

El término “agente citotóxico”, que también puede ser un agente anticancerígeno, significa una sustancia que es tóxica para las células y disminuye o inhibe la función de las células y/o causa la destrucción de las células. Típicamente, la sustancia es una molécula natural derivada de un organismo vivo (o un producto natural preparado en forma sintética). Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, aunque no a modo de limitación, toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de bacterias (por ejemplo, toxinas de difteria, entotoxinas y exotoxinas de *Pseudomonas*, enterotoxinas de estafilococo A), hongos (por ejemplo, α -sarcina, restrictocina), plantas (por ejemplo, abrina, ricina, modeccina, viscumina, proteína anti-viral de hierba carmín, saporina, gelonina, momoridina, tricosantina, toxina de cebada, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca mericana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *saponaria officinalis*, mitegelina, restrictocina, fenomicina, neomicina, y los tricotecenos) o animales (por ejemplo, RNAsas citotóxicas, tales como RNAsas pancreáticas extracelulares; DNasa I, incluidos fragmentos y/o variantes de ellas).

Un agente anticancerígeno puede incluir cualquier agente químico que inhiba, o que esté diseñado para inhibir, una célula cancerosa o una célula que probablemente se torne cancerosa o genere progenie tumorigénica (por ejemplo, células tumorigénicas). Dichos agentes químicos suelen dirigirse a procesos intracelulares necesarios para el crecimiento o la división celular, y así son particularmente efectivos contra células cancerosas, que generalmente crecen y se dividen rápidamente. Por ejemplo, la vincristina despolimeriza los microtúbulos, y así impide que las células ingresen en la mitosis. Dichos agentes se suelen administrar, y a menudo resultan más efectivos, en combinación, por ejemplo, en la formulación CHOP.

Los ejemplos de agentes anticancerígenos que se pueden usar en combinación con el tratamiento de CAR CLDN de la invención incluyen, aunque no a modo de limitación, agentes alquilantes, alquil sulfonatos, anastrozol, amanitinas, aziridinas, etileniminas y metilamelaminas, acetogeninas, una camptotecina, BEZ-235, bortezomib, briostatina, calistatina, CC-1065, ceritinib, crizotinib, criptoficinas, dolastatina, duocarmicina, eleuterobina, erlotinib, pancratistatina, una sarcodictina, espongistatina, mostazas de nitrógeno, antibióticos, enediina dinemicina, bisfosfonatos, esperamicina, cromóforos antibióticos de cromoproteína enediina, aclacinomicinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, canfosfamida, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, ciclosfosfamida, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina, epirubicina, esorrubicina, exemestano, fluorouracilo, fulvestrant, gefitinib, idarrubicina, lapatinib, letrozol, lonafarnib, marcelomicina, megestrol acetato, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, pazopanib, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rapamicina, rodorrubicina, sorafenib, estreptonigrina, estreptozocina, tamoxifeno, tamoxifeno citrato, temozolomida, tepodina, tipifarnib, tubercidina, ubenimex, vandetanib, vorozol, XL-147, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos, análogos de ácido fólico,

análogos de purina, andrógenos, anti-adrenales, reforzador de ácido fólico tal como ácido frolínico, aceglatona, aldofosfamida glucósido, ácido aminolevulínico, eniluracilo, amsacrina, bestrabucilo, bisantreno, edatraxato, defofamina, demecolcina, diaziquona, elfornitina, acetato de eliptinio, epotilona, etoglucid, nitrato de galio, hidroxurea, lentinano, lonidainina, maitansinoides, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarrubicina, losoxantrona, ácido podofilínico, 2-etilhidrazida, procarbazina, complejo de polisacáridos, razoxana; rizoxina; SF-1126, sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinosida; ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, vinblastina; platino; etopósido; ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecano, inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina; retinoides; capecitabina; combretastatina; leucovorina; oxaliplatino; XL518, inhibidores de PKC-alfa, Raf, H-Ras, EGFR y VEGF-A que reducen la proliferación celular, y sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. También incluidos en esta definición se encuentran los agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores tales como anti-estrógenos y anticuerpos selectivos del receptor de estrógeno, inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas suprarrenales, y anti-andrógenos; así como troxacitabina (un análogo nucleósido citosina de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas, PROLEUKIN® rIL-2; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH;

vinorelbina y esperamicinas, y sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

Los agentes anticancerígenos particularmente preferidos comprenden compuestos disponibles comercial o clínicamente, tales como erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), docetaxel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (fluorouracilo, 5-fluorouracilo, CAS Nro. 51-21-8), gemcitabina (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (CAS Nro. 391210-10-9, Pfizer), cisplatino (cis-diamina, dicloroplatino(II), CAS Nro. 15663-27-1), carboplatin (CAS Nro. 41575-94-4), paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), temozolomida (4-metil-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo[4.3.0]nona-2,7,9-trieno-9-carboxamida, CAS Nro. 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), tamoxifeno ((Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenoxi]-N,N-dimetiletanamina, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®), y doxorubicina (ADRIAMYCIN®). Los agentes anticancerígenos disponibles comercial o clínicamente adicionales comprenden oxaliplatino (ELOXATIN®, Sanofi), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), sunitinib (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), imatinib mesilato (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (inhibidor de Mek, Exelixis, WO 2007/044515), ARRY-886 (inhibidor de Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (inhibidor de PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (inhibidor de PI3K, Novartis), XL-147 (inhibidor de PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), leucovorina (ácido folínico), rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), lonafarnib (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), irinotecán (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), tipifarnib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (sin Cremophor), formulaciones en nanopartículas modificadas con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners,

Schaumberg, II), vandetanib (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), clorambucilo, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirolimus (TORISEL®, Wyeth), pazopanib (GlaxoSmithKline), canfosfamida (TELCYTA®, Telik), tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN®, NEOSAR®); vinorelbina (NAVELBINE®); capecitabina (XELODA®, Roche), tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX®; tamoxifeno citrato, FARESTON® (toremifina citrato) MEGASE® (megestrol acetato), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), formestanina, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol; Novartis), y ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca).

El término “sal farmacéuticamente aceptable” o “sal” significa sales orgánicas o inorgánicas de una molécula o macromolécula. Las sales de adición de ácido se pueden formar con grupos amino. Los ejemplos de sales incluyen, sin limitaciones, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, ioduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato de ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato de ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metansulfonato, etansulfonato, bencensulfonato, p-toluensulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede involucrar la inclusión de otra molécula, tal como un ión de acetato, un ión de succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que establezca la carga en el compuesto original. Más aún, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Cuando múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable, la sal puede tener múltiples contraiones. Por ende, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o varios átomos cargados y/o uno o varios contraiones.

“Solvato farmacéuticamente aceptable” o “solvato” se refiere a una asociación de una o varias moléculas de solvente y una molécula o macromolécula. Los

ejemplos de solventes que forman solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque no a modo de limitación, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina.

En otras formas de realización, los tratamientos de CAR CLDN de la presente invención se pueden usar en combinación con cualquiera de un número de anticuerpos (o agentes inmunoterapéuticos) actualmente en ensayos clínicos o disponibles en el comercio. A al fin, los linfocitos sensibles a CLDN divulgados se pueden usar en combinación con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en abagovomab, adecatumumab, afutuzumab, alemtuzumab, altumomab, amatuximab, anatumomab, arcitumomab, bavituximab, bectumomab, bevacizumab, bivatumumab, blinatumomab, brentuximab, cantuzumab, catumaxomab, cetuximab, citatumumab, cixutumumab, clivatuzumab, conatumumab, daratumumab, drozitumab, duligotumab, dusigitumab, detumomab, dacetuzumab, dalotuzumab, ecromeximab, elotuzumab, ensituximab, ertumaxomab, etaracizumab, farletuzumab, ficlatuzumab, figitumumab, flanvotumab, futuximab, ganitumab, gemtuzumab, girentuximab, glembatumumab, ibritumomab, igovomab, imgatuzumab, indatuximab, inotuzumab, intetumumab, ipilimumab, iratumumab, labetuzumab, lambrolizumab, lexatumumab, lintuzumab, lorvotuzumab, lucatumumab, mapatumumab, matuzumab, milatumumab, minretumomab, mitumomab, moxetumomab, narnatumab, naptumomab, **necitumumab**, nimotuzumab, nivolumab, nofetumomab, obinutuzumab, ocaratuzumab, ofatumumab, olaratumab, olaparib, onartuzumab, oportuzumab, oregovomab, panitumumab, parsatumumab, patritumab, pentumomab, pertuzumab, pidilizumab, pintumomab, pritumumab, racotumomab, radretumab, ramucirumab, rilotumumab, rituximab, robatumumab, satumomab, selumetinib, sibrotuzumab, siltuximab, simtuzumab, solitomab, tacatumumab, taplitumumab, tenatumumab, teprotumumab, tigatuzumab, tositumomab, trastuzumab, tucotuzumab,

ublituximab, veltuzumab, vorsetuzumab, votumumab, zalutumumab, CC49, 3F8, MDX–1105 y MEDI4736, y combinaciones de ellos.

Otras formas de realización comprenden el uso de anticuerpos aprobados para la terapia del cáncer, que incluyen, aunque sin limitaciones, rituximab, gemtuzumab ozogamicina, alemtuzumab, ibritumomab tiuxetan, tositumomab, bevacizumab, cetuximab, patitumumab, ofatumumab, ipilimumab y brentuximab vedotin. El especialista en el arte será capaz de identificar fácilmente los agentes anticancerígenos adicionales que son compatibles con las enseñanzas de la presente.

La presente invención también proporciona la combinación de los tratamientos de CAR CLDN con radioterapia (es decir, cualquier mecanismo para inducir daño en el ADN localmente dentro de las células tumorales, tal como radiación gamma, rayos X, radiación UV, microondas, emisiones electrónicas y similares). La terapia de combinación que usa la entrega dirigida de radioisótopos a células tumorales también está contemplada, y los tratamientos de CAR CLDN divulgados se pueden usar en conexión con un agente anticancerígeno dirigido u otro medio dirigido. Típicamente, la terapia de radiación se administra en pulsos durante un período de tiempo desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 2 semanas. La terapia de radiación se puede administrar a sujetos que tienen cáncer de cabeza y cuello durante aproximadamente 6 a 7 semanas. Opcionalmente, la terapia de radiación se puede administrar como dosis única o en dosis múltiples secuenciales.

X. Diagnóstico

La invención proporciona métodos *in vitro* e *in vivo* para detectar, diagnosticar o monitorear la eficiencia de cualquier transducción de linfocitos o el efecto de cualquier linfocito sensible a CLDN sobre células tumorales, incluidas células tumorigénicas. Dichos métodos incluyen identificar un individuo que tiene cáncer (por ejemplo, un tumor CLDN positivo) para el

tratamiento o monitoreo de la progresión del cáncer, que comprende interrogar al paciente o una muestra obtenida del paciente (ya sea *in vivo* o *in vitro*) con un anticuerpo según se describe en la presente, antes, durante o después del tratamiento con linfocitos sensibles a CLDN, y detectar la presencia o ausencia, o el nivel de asociación, del anticuerpo a moléculas blanco unidas o libres en la muestra. En algunas formas de realización, el anticuerpo CLDN comprende una etiqueta detectable o molécula reportera según se describe en la presente. En incluso otras formas de realización (por ejemplo, hibridación *in situ*, o ISH), una sonda de ácido nucleico que reacciona con un determinante de CLDN genómico se usa en la detección, el diagnóstico o el monitoreo del trastorno proliferativo.

Más generalmente, la presencia y/o los niveles de determinantes de CLDN se pueden medir usando cualquiera de un número de técnicas disponibles para la persona especialista en el arte para el análisis de proteínas o ácidos nucleicos, por ejemplo, mediciones físicas directas (por ejemplo, espectrometría de masa), ensayos de unión (por ejemplo, inmunoensayos, ensayos de aglutinación y ensayos inmunocromatográficos), tecnología de reacción en cadena de polimerasa (PCR, RT-PCR; RT-qPCR), tecnología de oligonucleótidos ramificados, tecnología de Northern blot, tecnología de hibridación de oligonucleótidos y tecnología de hibridación *in situ*. El método también puede comprender medir una señal que resulta de una reacción química, por ejemplo, un cambio en la absorbancia óptica, un cambio en la fluorescencia, la generación de quimioluminiscencia o electroquimioluminiscencia, un cambio en la reflectividad, el índice de refracción o la dispersión de la luz, la acumulación o liberación de etiquetas detectables desde la superficie, la oxidación o reducción o especies redox, una corriente o potencial eléctrico, cambios en los campos magnéticos, etc. Las técnicas de detección adecuadas pueden detectar eventos de unión midiendo la participación de reactivos de unión marcados a través de la medición de las

marcas por su fotoluminiscencia (por ejemplo, por medio de la medición de la fluorescencia, fluorescencia resuelta en el tiempo, fluorescencia de onda evanescente, fósforos de sobre-conversión, fluorescencia multi-fotón, etc.), quimioluminiscencia, electroquimioluminiscencia, dispersión de luz, absorbancia óptica, radioactividad, campos magnéticos, actividad enzimática (por ejemplo, midiendo la actividad enzimática a través de reacciones enzimáticas que causan cambios en la absorbancia óptica o fluorescencia, o causan la emisión de quimioluminiscencia). Alternativamente, se pueden usar técnicas de detección que no requieren el uso de etiquetas, por ejemplo, técnicas basadas en la medición de masa (por ejemplo, mediciones de ondas acústicas en superficie), índice de refracción (por ejemplo, mediciones por resonancia en plasmón de superficie), o la luminiscencia inherente de un analito.

En algunas formas de realización, la asociación del agente de detección con células o componentes celulares particulares en la muestra indica que la muestra puede contener células tumorigénicas, lo cual denota que el individual que tiene cáncer puede ser tratado de manera efectiva con las composiciones según se describe en la presente.

En ciertas formas de realización preferidas, los ensayos pueden comprender ensayos de inmunohistoquímica (IHC) o variantes de ellos (por ejemplo, fluorescentes, cromogénicos, estándar ABC, estándar LSAB, etc.), inmunocitoquímica o variantes de ellos (por ejemplo, directos, indirectos, fluorescentes, cromogénicos, etc.) o hibridación *in situ* (ISH) o variantes de ellos (por ejemplo, hibridación *in situ* cromogénica (CISH) o hibridación *in situ* de fluorescencia (ADN-FISH o ARN-FISH)).

En tal sentido, ciertos aspectos de la presente invención comprenden el uso de CLDN marcado para inmunohistoquímica (IHC). Más particularmente, CLDN IHC se puede usar como herramienta de diagnóstico para ayudar en el diagnóstico de diversos trastornos proliferativos y para monitorear la potencial

respuesta a los tratamientos, que incluyen la terapia con anticuerpos CLDN. Como se analiza en la presente y se muestra en los Ejemplos a continuación, los ensayos de diagnóstico compatibles se pueden realizar en tejidos que han sido fijados químicamente (incluyendo, aunque sin limitaciones: formaldehído, gluteraldehído, tetróxido de osmio, dicromato de potasio, ácido acético, alcoholes, sales de zinc, cloruro mercurico, tetraóxido de cromo y ácido pícrico) e incrustados (incluyendo, aunque sin limitaciones: glicol metacrilato, parafina y resinas) o preservado por congelación. Tales ensayos se pueden usar como guía para tomar decisiones de tratamiento y determinar regímenes y horarios de dosis.

Otros aspectos particularmente compatibles de la invención implican el uso de hibridación *in situ* para detectar o monitorear determinantes de CLDN. La tecnología de hibridación *in situ*, o ISH, es bien conocida por el especialista en el arte. Brevemente, las células se fijan, y se agregan a ellas sondas detectables que contienen una secuencia de nucleótidos específica. Si las células contienen secuencias de nucleótidos complementarias, las sondas, que pueden detectarse, se hibridarán a ellas. Usando la información sobre secuencias proporcionada en la presente, se pueden diseñar sondas para identificar células que expresan determinantes genotípicos de CLDN. Las sondas preferentemente se hibridan a una secuencia de nucleótidos que corresponde a dichos determinantes. Las condiciones de hibridación se pueden optimizar de manera rutinaria para minimizar la señal de fondo mediante hibridación no completamente complementaria a través de, preferentemente, las sondas que son preferentemente completamente complementarias al determinante de CLDN seleccionado. En formas de realización seleccionadas, las sondas se marcan con tintura fluorescente adosada a las sondas, que es fácilmente detectable por metodología de fluorescencia estándar.

Los ensayos de diagnóstico o diagnóstico compatibles *in vivo* pueden comprender técnicas de imagen o monitoreo reconocidas en el arte, tales como

imágenes por resonancia magnética, tomografía computada (por ejemplo, escaneo CAT), tomografía por emisión de positrones (por ejemplo, escaneo PET) radiografía, ultrasonido, etc., como sabe el especialista en el arte.

En una forma de realización particularmente preferida, los anticuerpos divulgados en la presente se pueden usar para detectar y cuantificar los niveles de un determinante particular (por ejemplo, CLDN) en la muestra de un paciente (por ejemplo, de plasma o sangre) que, a su vez, se puede usar para detectar, diagnosticar o monitorear trastornos proliferativos tanto antes como después del tratamiento con los linfocitos sensibles a CLDN. En una forma de realización relacionada, los anticuerpos divulgados en la presente se pueden usar para detectar, monitorear y/o cuantificar las células tumorales circulantes *in vivo* o *in vitro* (WO 2012/0128801) en combinación con los tratamientos con linfocitos sensibles a CLDN divulgados. En incluso otra forma de realización, las células tumorales circulantes pueden comprender células tumorigénicas.

En ciertas formas de realización de la invención, las células tumorigénicas en un sujeto o una muestra de un sujeto se pueden evaluar o caracterizar usando los anticuerpos divulgados antes de la terapia o el régimen de CAR CLDN para establecer una condición basal. En otros ejemplos, las células tumorigénicas se pueden evaluar a partir de una muestra que se deriva de un sujeto que fue tratado.

XI. Artículos de manufactura

La invención además incluye paquetes y kits farmacéuticos que comprenden uno o varios recipientes, en donde un recipiente puede comprender una o varias dosis de transformación de un plásmido o vector CAR CLDN de la invención. En ciertas formas de realización, el paquete o kit contiene una preparación de vector (por ejemplo, lentiviral o retroviral) que comprende un ácido nucleico que codifica un CAR CLDN, con o sin uno o varios reactivos adicionales, y opcionalmente un medio para efectuar la transducción. Preferentemente, el kit además incluye el medio para monitorear y caracterizar

la preparación de los linfocitos sensibles a CLDN antes de la administración.

En formas de realización seleccionadas, los kits compatibles con la invención permiten al usuario producir los linfocitos sensibles a CLDN, monitorear las tasas de transducción y caracterizar la población resultante de linfocitos sensibles a CLDN para asegurar la calidad antes de la administración. Por lo tanto, un kit de la invención generalmente contiene una formulación farmacéuticamente aceptable del ácido nucleico (o vector) CAR y, opcionalmente, uno o varios reactivos en el mismo recipiente o en recipientes diferentes. En formas de realización preferidas, los vectores de CAR CLDN comprenden vectores virales (por ejemplo, lentivirales o retrovirales) que permiten la transducción de células huésped seleccionadas para proporcionar los linfocitos sensibilizados divulgados. En ciertas formas de realización, las células huésped seleccionadas son autólogas (es decir, derivadas del paciente a tratar) mientras que en otras formas de realización, las células huésped seleccionadas son alogénicas. Algunos aspectos de la invención se dirigen a kits que incluyen células alogénicas junto con el vector CAR CLDN. Incluso otra forma de realización comprende kits o recipientes que incorporan una composición farmacéutica que comprende linfocitos sensibles a CLDN alogénicos. En dichos kits, el recipiente puede comprender una bolsa para infusión que permite que los linfocitos sensibles a CLDN sean administrados directamente al paciente.

Los kits también pueden contener otras formulaciones o dispositivos farmacéuticamente aceptables, ya sea para el diagnóstico o la terapia de combinación. Los ejemplos de dispositivos o instrumentos de diagnóstico incluyen aquellos que se pueden usar para detectar, monitorear, cuantificar o perfilar células o marcadores asociados con los linfocitos sensibles a CLDN, la eficiencia de transformación o el trastorno proliferativo a tratar. En formas de realización particularmente preferidas, los dispositivos se pueden usar para detectar, monitorear y/o cuantificar células tumorales circulantes *in vivo* o *in*

vitro. En incluso otra forma de realización preferida, las células tumorales circulantes pueden comprender células tumorigénicas.

Cuando los componentes seleccionados del kit se proporcionan en una o varias soluciones líquidas, la solución líquida puede ser no acuosa, aunque se prefiere una solución acuosa, y particularmente se prefiere una solución acuosa estéril. Las formulaciones del kit (por ejemplo, un vector viral) también se pueden proporcionar como polvo seco o en forma liofilizada que se puede reconstituir tras la adición de un líquido apropiado. El líquido usado para la reconstitución puede estar contenido en un recipiente separado. Dichos líquidos pueden comprender búferes estériles farmacéuticamente aceptables u otros diluyentes, tales como agua bacteriostática para uso inyectable, solución salina abuferada con fosfato, solución de Ringer o solución de dextrosa. Cuando el kit comprende los plásmidos o vectores CAR de la invención en combinación con reactivos adicionales, la solución se puede premezclar, ya sea en combinación equivalente molar, o con un componente en exceso respecto del otro. Alternativamente, los plásmidos de la invención y cualquier co-reactivo opcional se pueden mantener por separado en recipientes distintos antes de la transformación de los linfocitos. En otras formas de realización preferidas, el recipiente del kit puede comprender formulaciones líquidas de linfocitos sensibles a CLDN alogénicos.

El kit puede comprender uno o múltiples recipientes y una etiqueta o prospecto en, sobre o asociado con el recipiente, que indica que la composición incluida se usa para preparar células para tratar la enfermedad en cuestión. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes se pueden elaborar de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. Los recipientes pueden comprender un puerto de acceso estéril, por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón que se puede perforar con la aguja de una jeringa hipodérmica.

En algunas formas de realización, el kit puede contener un medio con el cual administrar los linfocitos sensibilizados y cualquier componente opcional a un paciente, por ejemplo, una o varias agujas o jeringas (prellenadas o vacías), un gotero para ojos, pipeta o cualquier aparato similar, a partir del cual la formulación se pueda inyectar o introducir en el sujeto o aplicar a un área de enfermedad del cuerpo. Los kits de la invención también incluyen típicamente un medio para contener los viales, o similares, y otros componentes en estrecho confinamiento para la venta comercial, tales como, por ejemplo, recipientes de plástico soplado en los cuales se colocan y mantienen los viales y otros aparatos deseados.

XIII. Varios

A menos que se defina lo contrario en la presente, los términos científicos y técnicos usados en relación con la invención tienen los significados que entiende comúnmente el especialista en el arte. Más aún, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular incluyen el plural, y los términos en plural incluyen el singular. Además, los rangos proporcionados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas incluyen ambos puntos finales y todos los puntos entre ellos. Por lo tanto, un rango de 2,0 a 3,0 incluye 2,0, 3,0 y todos los puntos entre 2,0 y 3,0.

En general, las técnicas de cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química descritos en la presente son aquellas bien conocidas y comúnmente usadas en el arte. La nomenclatura usada en la presente, en asociación con dichas técnicas, también es comúnmente usada en el arte. Los métodos y las técnicas de la invención generalmente se realizan de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en el arte y como se describe en diversas referencias citadas en toda la presente memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario.

XIV. Referencias

La divulgación completa de todas las patentes, solicitudes de patentes y

publicaciones, y material disponible electrónicamente (incluyendo, por ejemplo, presentaciones de secuencias de nucleótidos en, por ejemplo, GenBank y RefSeq, y presentaciones de secuencias de aminoácidos en, por ejemplo, SwissProt, PIR, PRF, PDB, y traducciones desde regiones de codificación anotadas en GenBank y RefSeq) citadas en la presente se incorporan por referencia, independientemente de si la frase “incorporada/o por referencia” se usa o no en relación con la referencia particular. La anterior descripción detallada y los ejemplos que siguen se han proporcionado con fines de claridad de entendimiento únicamente. No han de entenderse limitaciones innecesarias a partir de ellos. La invención no se limita a los detalles exactos mostrados y descritos. Las variaciones obvios para el especialista en el arte están incluidas en la invención definida por las reivindicaciones. Todo título de sección se usa en la presente con fines organizativos solamente y no debe interpretarse como una limitación al método descrito objeto de la presente.

XV. Secuencias

Adjuntas a la presente solicitud se encuentran figuras y un listado de secuencias que comprende un número de secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos. La siguiente Tabla 2 proporciona una síntesis de las secuencias incluidas.

TABLA 2

SEQ ID NO	Descripción
1	Proteína de región constante de cadena liviana (LC) Kappa
2	Proteína IgG1 de región constante de cadena pesada (HC)
3	Proteína scFv enlazador
4	SC27.108 scFv ácido nucleico
5	SC27.108 scFv aminoácido
6	SC27.204v2 scFv ácido nucleico

7	SC27.204v2 scFv aminoácido
8	SCT1–h27.108 ácido nucleico
9	SCT1–h27.108 aminoácido
10	SCT1–h27.204v2 ácido nucleico
11	SCT1–h27.204v2 aminoácido
12–19	Reservado
20	SC27.1 VL ADN
21	SC27.1 VL proteína
22	SC27.1 VH ADN
23	SC27.1 VH proteína
24–59	Clones de ratón adicionales como en SEQ ID NOS: 20–23
60	hSC27.1 VL ADN
61	hSC27.1 VL proteína
62	hSC27.1 VH ADN
63	hSC27.1 VH proteína
64–75	Clones humanizados adicionales como en SEQ ID NOS: 60–63
76–77	hSC27.108v1 VL ADN y proteína
78–79	hSC27.22–VH1–8 VH ADN y proteína
80–81	hSC27.22–VH1–46 VH ADN y proteína
82–83	hSC27.22–VH1–69 VH ADN y proteína
84–85	hSC27.204v1 ADN y proteína
86–87	hSC27.204v2 ADN y proteína
88–89	hSC27.204v3 ADN y proteína
90–91	hSC27.204v4 ADN y proteína
92–93	hSC27.204v5 ADN y proteína
94–95	hSC27.204v6 ADN y proteína
96–97	hSC27.204v7 ADN y proteína
98–99	hSC27.204v8 ADN y proteína

100–101	hSC27.204v9 ADN y proteína
102–103	hSC27.204v10 ADN y proteína
104–105	hSC27.204v11 ADN y proteína
106–107	hSC27.204v12 ADN y proteína
108–109	hSC27.204v13 ADN y proteína
110–111	hSC27.204v14 ADN y proteína
112–113	hSC27.204v15 ADN y proteína
114–115	hSC27.1 longitud completa LC y HC proteína
116–117	hSC27.22 longitud completa LC y HC proteína
118–119	hSC27.108 longitud completa LC y HC proteína
120–121	hSC27.204 longitud completa LC y HC proteína
122	hSC27.22ss1 longitud completa HC proteína
123	hSC27.22–VH1–8 longitud completa HC proteína
124	hSC27.22–VH1–46 longitud completa HC proteína
125	hSC27.22–VH1–69 longitud completa HC proteína
126	hSC27.22 IgG2 longitud completa HC proteína
127	hSC27.22 IgG4 R409K longitud completa HC proteína
128	hSC27.22 IgG4 S228P longitud completa HC proteína
129	hSC27.22 IgG4 S228P K370E R409K longitud completa HC proteína
130	hSC27.22 IgG4 K370E longitud completa HC proteína
131	hSC27.22 IgG4 S228P K370E longitud completa HC proteína
132	hSC27.22 IgG4 C127S S228P longitud completa HC proteína
133	hSC27.22 IgG4 C127S K370E longitud completa HC proteína
134	hSC27.22 IgG4 C127S S228P K370E longitud completa HC proteína
135	hSC27.108v1 longitud completa LC proteína
136	hSC27.204v1 longitud completa HC proteína

137	hSC27.204v2 longitud completa HC proteína
138	hSC27.204v3 longitud completa HC proteína
139	hSC27.204v4 longitud completa HC proteína
140	hSC27.204v5 longitud completa HC proteína
141	hSC27.204v6 longitud completa HC proteína
142	hSC27.204v7 longitud completa HC proteína
143	hSC27.204v8 longitud completa HC proteína
144	hSC27.204v9 longitud completa HC proteína
145	hSC27.204v10 longitud completa HC proteína
146	hSC27.204v11 longitud completa HC proteína
147	hSC27.204v12 longitud completa HC proteína
148	hSC27.204v13 longitud completa HC proteína
149	hSC27.204v14 longitud completa HC proteína
150	hSC27.204v15 longitud completa HC proteína
151–156	hSC27.1 CDRL1; CDRL2; CDRL3, CDRH1; CDRH2; CDRH3
157–162	hSC27.22 CDRL1; CDRL2; CDRL3, CDRH1; CDRH2; CDRH3
163–168	hSC27.108 CDRL1; CDRL2; CDRL3, CDRH1; CDRH2; CDRH3
169–174	hSC27.204 CDRL1; CDRL2; CDRL3, CDRH1; CDRH2; CDRH3
175	CDRH2 de hSC27.204v1; hSC27.204v5 y hSC27.405v13
176	CDRH2 de hSC27.204v2; hSC27.204v6 y hSC27.405v14
177	CDRH2 de hSC27.204v3; hSC27.204v7 y hSC27.405v15
178	Codón optimizado hSC27.22ss1 longitud completa HC ADN

Como se discute en el Ejemplo 4 más abajo, la Tabla 2 anterior se puede usar además para designar SEQ ID NOS para CDR de Kabat ilustrativas delineadas en las FIGS. 3A y 3B. Más en particular, las FIGS. 3A y 3B denotan las tres

CDR de Kabat de cada secuencia de región variable de cadena pesada (CDRH) y liviana (CDRL), y la Tabla 2 anterior proporciona la asignación de una designación de SEQ ID que se puede aplicar a cada CDRL1, CDRL2 y CDRL3 de la cadena liviana y cada CDRH1, CDRH2 y CDRH3 de la cadena pesada. Usando esta metodología, a cada CDR única establecida en las FIGS. 3A y 3B se puede asignar un SEQ ID NO secuencial y se puede usar para proporcionar los anticuerpos derivados de la presente invención.

XVI. Listado de tumores

Los tipos celulares de tumores PDX se denotan por una abreviatura seguida por un número, lo cual indica la línea celular tumoral particular. El número de pasaje de la muestra evaluada se indica por p0–p# anexo a la designación de la muestra, donde p0 indica una muestra sin pasaje obtenida directamente del tumor de un paciente y p# indica el número de veces que el tumor ha pasado a través de un ratón antes de la evaluación. Según se usa en la presente, las abreviaturas de los tipos y subtipos tumorales se muestran en la Tabla 3 de la siguiente manera:

TABLA 3

<u>Tipo tumoral</u>	<u>Abreviatura</u>	<u>Subtipo tumoral</u>	<u>Abreviatura</u>
Mama	BR		
		Receptor de estrógeno positivo y/o receptor de progesterona positivo	BR–ERPR
		ERBB2/Neu positivo	BR– ERBB2/Neu

		HER2 positivo	BR-HER2
		triple-negativo	TNBC
		Subtipo de claudina de triple-negativo	TNBC-CLDN
Colorrectal	CR		
Endometrial	EN		
Gástrico	GA		
		Adenocarcinoma difuso	GA-Ad-Dif/Muc
		Adenocarcinoma intestinal	GA-Ad-Int
		Tumores estromales	GA-GIST
Glioblastoma	GB		
Cabeza y cuello	HN		
Riñón	KDY		
		Carcinoma de células renales claras	KDY-CC

		Carcinoma de células renales capilares	KDY-PAP
		Carcinoma de células transicionales o urotelial	KDY-URO
		Desconocido	KDY-UNK
Hígado	LIV		
		Carcinoma hepatocelular	LIV-HCC
		Colangiocarcinoma	LIV-CHOL
Linfoma	LN		
Pulmón	LU		
		Adenocarcinoma	LU-Ad
		Carcinoide	LU-CAR
		Neuroendocrino de células grandes	LU-LCC
		Células no pequeñas	NSCLC

		Células escamosas	LU–SCC
		Células pequeñas	SCLC
		Células fusiformes	LU–SPC
Melanoma	MEL		
Ovario	OV		
		Células claras	OV–CC
		Endometroide	OV–END
		Subtipo mixto	OV–MIX
		Mesodérmico mixto maligno	OV–MMMT
		Mucinoso	OV–MUC
		Neuroendocrino	OV–NET
		Seroso papilar	OV–PS
		Seroso	OV–S
		Células pequeñas	OV–SC

		Carcinoma de células transicionales	OV-TCC
Pancreático	PA		
		Carcinoma de células acinares	PA-ACC
		Carcinoma duodenal	PA-DC
		Adenocarcinoma mucinoso	PA-MAD
		Neuroendocrino	PA-NET
		Adenocarcinoma	PA-PAC
		Adenocarcinoma de tipo exocrino	PA-PACe
		Adenocarcinoma ductal	PA-PDAC
		Adenocarcinoma ampular	PA-AAC
Próstata	PR		
Piel	SK		

		melanoma	MEL
		Carcinoma de células escamosas	SK-SCC

EJEMPLOS

La invención, así descrita generalmente antes, se entenderá mejor por referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no tienen por fin limitar la presente invención. Los ejemplos no implican que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio en peso, la temperatura es en grados centígrados, y la presión es atmosférica o cercana a ella.

Ejemplo 1

Identificación de la expresión de CLDN4, CLDN6 y CLDN9 en tumores

Para caracterizar la heterogeneidad celular de los tumores sólidos que existen en los pacientes con cáncer, ayudar en la identificación de CSC usando marcadores fenotípicos particulares, e identificar blancos terapéuticos clínicamente relevantes, un gran banco de tumores PDX fue desarrollado y mantenido usando técnicas reconocidas en el arte. El banco de tumores PDX, que comprende una gran cantidad de líneas celulares tumorales discretas, fue propagado en ratones inmunocomprometidos a través de múltiple pasajes de células tumorales heterogéneas originalmente obtenidas de numerosos pacientes con cáncer afectados por una variedad de tumores sólidos malignos. La continua disponibilidad de una gran cantidad de líneas celulares tumorales PDX de pasaje temprano discretas que tienen linajes bien definidos facilita enormemente la identificación y la aislación de CSC, ya que los tumores PDX

permiten la caracterización reproducible y repetida de CSC. El uso de líneas celulares tumorales PDX sometidas mínimamente a pasaje simplifica la experimentación *in vivo* y proporciona resultados fácilmente verificables. Más aún, los tumores PDX de pasaje temprano responden a agentes terapéuticos tales como irinotecán (es decir, Camptosar®), lo cual proporciona información clínicamente relevante sobre los mecanismos subyacentes que impulsan el crecimiento del tumor, la resistencia a las actuales terapias y la recurrencia del tumor.

Para generar ARN a partir de las líneas celulares tumorales PDX, los tumores fueron resecados de los ratones luego de que alcanzaran los 800 – 2.000 mm³, y los tumores fueron disociados en suspensiones de células únicas usando técnicas de digestión enzimática reconocidas en el arte (véase, por ejemplo, U.S.P.N. 2007/0292414). Las preparaciones celulares tumorales PDX disociadas seleccionadas se limpiaron de células de ratón y se clasificaron sobre la base de su expresión de CD46^{hi} y/o CD324, marcadores de subpoblaciones de CSC (véase U.S.P.N 2013/0260385 para la definición de CD46^{hi}). Las células que expresaban EpCAM, CD46^{hi} y/o CD324 de humano (es decir, CSC) o EpCAM pero no CD46^{hi} y/o CD324 (es decir, células NTG), fueron aisladas por FACS usando un clasificador de células BD FACSAria y fueron lisadas en búfer de lisis RLTplus RNA (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Los lisados luego se almacenaron a –80 °C y se descongelaron para la extracción de ARN. Tras el descongelamiento, el ARN total se extrajo usando un kit de aislación RNeasy (Qiagen, GmbH) siguiendo las instrucciones del proveedor y luego se cuantificó usando un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific) y/o un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), nuevamente usando los protocolos del fabricante y los parámetros recomendados para el instrumento. Las preparaciones de ARN total resultantes fueron evaluadas por análisis de secuenciación genética y expresión génica. Se realizó la secuenciación de transcriptoma entero de ARN calificado, de alta

calidad, usando un Sequencing by Oligo Ligation/Detection (SOLiD) 4.5 de Applied Biosystems (ABI) o un sistema de secuenciación de próxima generación SOLiD 5500xl (Life Technologies). Se generó ADNc a partir de 1 ng de muestras de ARN total usando un protocolo de transcriptoma entero modificado de ABI diseñado para ARN total de baja entrada o el sistema de secuenciación Ovation RNA V2™ (NuGEN Technologies). La biblioteca de ADNc resultante fue fragmentada, y se agregaron aceptadores de código de barras para permitir la combinación de bibliotecas de fragmentos de diferentes muestras durante las corridas de secuenciación. Los datos generados por la plataforma SOLiD mapearon 34.609 genes según se anotó con RefSeq versión 47 usando NCBI versión hg19.2 del genoma humano publicado y proporcionaron mediciones verificables de los niveles de ARN en la mayoría de la muestras. Los datos de secuenciación de la plataforma SOLiD se representan nominalmente como un valor de expresión de transcripto usando la métrica RPM (lecturas por millón) o RPKM (lecturas por kilobase por millón) mapeadas a regiones exón de genes, lo cual permite que el análisis de expresión génica básico sea normalizado y enumerado como RPM_Transcripto o RPKM_Transcripto.

Los resultados de la secuenciación de transcriptoma entero usando SOLiD demostraron una elevada expresión de ARNm de CLDN4 en CSC clasificadas en comparación con NTG en las siguientes líneas celulares PDX: BR13, BR22, OV100, PA20 y PA3, así como una alta expresión en poblaciones CSC adicionales, incluyendo BR36, OV106MET, OV72MET y OV91MET (FIG. 1). El ARNm de CLDN6 fue elevado en poblaciones de CSC clasificadas, incluyendo BR36, OV106MET, OV72MET y OV91MET (FIG. 1). A diferencia del caso para CLDN4 o CLDN6, se observó que el miembro de la familia relacionado, CLDN9, tenía baja expresión en todas las poblaciones tumorales clasificadas. A diferencia de las muestras tumorales, los tejidos normales de ovario y páncreas mostraron ausencia o un nivel muy bajo de expresión de

ARNm de los tres miembros de la familia: CLDN4, CLDN6 y CLDN9.

La identificación de una elevada expresión de ARNm de CLDN4 y CLDN6 en diferentes tipos de tumores humanos indicó que estos antígenos ameritaban una ulterior evaluación como potenciales blancos de diagnóstico y/o inmunoterapia.

Ejemplo 2

Clonación y expresión de proteínas CLDN recombinantes

A fin de deducir la relación entre secuencias de proteína claudina, se usó el programa AlignX del paquete de software de vector NTI para alinear 30 secuencias de proteína claudina de 23 genes CLDN humanos. Los resultados de esta alineación se muestran como dendrograma en la FIG. 2A. Una revisión de la figura muestra que CLDN6 y CLDN9 están muy estrechamente relacionados en secuencia, y aparecen adyacentes entre sí en la misma rama del dendrograma. La FIG. 2A también muestra que CLDN4 es el siguiente miembro de la familia más cercano a CLDN6. Una revisión más detallada de los datos muestra que la proteína CLDN6 humana está muy estrechamente relacionada con la secuencia de proteína CLDN9 humana en los dominios extracelulares (ECD), con >98% de identidad en ECD1 y >91% de identidad en ECD2 (FIG. 2B). También se descubrió que CLDN4 humana está estrechamente relacionada con CLDN6 humana en las secuencias ECD, con >84% de identidad en ECD1 y >78% de identidad en ECD2 (FIG. 2B). Sobre la base de estas relaciones de secuencias de proteínas, se postuló que la inmunización con un antígeno CLDN6 humano proporcionaría anticuerpos que reconocen CLDN6 humana que también tendrían reactividad cruzada con CLDN9 humana, y quizá también reactividad cruzada con CLDN4 humana.

A fin de determinar qué ortólogos de especies de CLDN6, CLDN9 y CLDN4 se requerirían para la detección de estos anticuerpos de claudina multirreactivos, se analizaron secuencias ECD de CLDN4, CLDN6 y CLDN9 provenientes de

cada una de las siguientes especies: humano, mono cynomolgus, ratón y rata. El análisis se realizó usando secuencias de proteína de las bases de datos AlignX y NCBI cuando estaban disponibles (los números de acceso NP de proteínas de humano, ratón y rata se indican en la FIG. 2C). Alternativamente, las secuencias de proteínas se dedujeron de la traducción de los genes CLDN de mono cynomolgus ensamblados por BLAST de secuencias de marco de lectura abierto CLDN humanas versus contiguos de secuenciación *shotgun* de genoma entero de mono cynomolgus. La inspección de estas alineaciones revela que: (1) las secuencias ECD de proteínas de mono cynomolgus deducidas para las proteínas CLDN4, CLDN6 y CLDN9 son 100% idénticas a las respectivas secuencias ECD humanas; (2) las secuencias ECD CLDN9 de ratón y rata son 100% idénticas a la secuencia de ortólogo humana; (3) las secuencias ECD CLDN4 y CLDN6 de ratón y rata difieren entre sí y de los respectivos ortólogos humanos. Por lo tanto, la generación de un conjunto de siete constructos que comprenden CLDN4 de humano, CLDN6 de humano, CLDN9 de humano, CLDN4 de ratón, CLDN6 de ratón, CLDN4 de rata y CLDN6 de rata debería permitir la determinación de reactividad cruzada para cualquier dominio de unión con todos los posibles 12 ortólogos.

Fragmentos de ADN que codifican proteínas CLDN6, CLDN4 y CLDN9 humanas

Para generar materiales moleculares y celulares útiles en la presente invención, relacionados con la proteína CLDN6 humana (hCLDN6), se sintetizó un fragmento de ADN optimizado con codón que codifica una proteína idéntica a la proteína NCBI acceso NP_067018 (IDT). Este clon de ADN se usó para toda la subsiguiente ingeniería de constructos que expresan la proteína madura hCLDN6 o fragmentos de ella. De manera similar, los fragmentos de ADN optimizados con codón que codifican proteínas idénticas a la proteína NCBI acceso NP_001296 para CLDN4 humana (hCLDN4), o la proteína NCBI

acceso NP_066192 para CLDN9 humana (hCLDN9) fueron adquiridos y usados para toda la subsiguiente ingeniería de constructos que expresan las proteínas hCLDN4 o hCLDN9, o fragmentos de ellas.

Fragmentos de ADN que codifican proteínas CLDN6 y CLDN4 de ratón

Para generar materiales moleculares y celulares útiles en la presente invención, relacionados con la proteína CLDN6 de ratón (mCLDN6), se sintetizó un fragmento de ADN optimizado con codón que codifica una proteína idéntica a la proteína NCBI acceso NP_061247 (IDT). Este clon de ADN se usó para toda la subsiguiente ingeniería de constructos que expresan la proteína madura mCLDN6 o fragmentos de ella. De manera similar, un fragmento de ADN optimizado con codón que codifica una proteína idéntica a la proteína NCBI acceso NP_034033 para CLDN4 de ratón (mCLDN4) fue adquirido y usado para toda la subsiguiente ingeniería de constructos que expresan la proteína mCLDN4 madura, o fragmentos de ella.

Fragmentos de ADN que codifican proteínas CLDN6 y CLDN4 de rata

Para generar materiales moleculares y celulares útiles en la presente invención, relacionados con la proteína CLDN6 de rata (rCLDN6), se sintetizó un fragmento de ADN optimizado con codón que codifica una proteína idéntica a la proteína NCBI acceso NP_001095834 (IDT). Este clon de ADN se usó para toda la subsiguiente ingeniería de constructos que expresan la proteína madura rCLDN6 o fragmentos de ella. De manera similar, un fragmento de ADN optimizado con codón que codifica una proteína idéntica a la proteína NCBI acceso NP_001012022 para CLDN4 de rata (rCLDN4) fue adquirido y usado para toda la subsiguiente ingeniería de constructos que expresan la proteína rCLDN4 madura, o fragmentos de ella.

Ingeniería de líneas celulares

Las líneas celulares modificadas por ingeniería genética que sobreexpresan las diversas proteínas CLDN enumeradas antes fueron construidas usando vectores lentivirales para transducir líneas celulares HEK–293T o 3T3 usando técnicas reconocidas en el arte. En primer lugar, se usó PCR para amplificar los fragmentos de ADN que codifican la proteína de interés (por ejemplo, hCLDN6, mCLDN6, rCLDN6, hCLDN9, hCLDN4, mCLDN4 o rCLDN4) usando los fragmentos de ADN sintetizados comercialmente descritos antes como plantillas. Luego, los productos de PCR individuales fueron subclonados en el sitio de clonación múltiple (MCS) del vector de expresión lentiviral, pCDH–EF1–MCS–T2A–GFP (System Biosciences), para generar una serie de vectores lentivirales. La secuencia T2A en los vectores pCDH–EF1–CLDN–T2A–GFP resultantes promueve la omisión ribosómica de una condensación de enlace peptídico, lo cual causa la expresión de dos proteínas independientes: expresión de alto nivel de la proteína CLDN específica codificada corriente arriba del péptido T2A, con co–expresión de la proteína marcadora GFP codificada corriente abajo del péptido T2A. Esta serie de vectores lentivirales se usó para crear líneas celulares HEK–293T o 3T3 estables separadas que sobreexpresan proteínas CLDN individuales usando técnicas estándar de transducción lentiviral bien conocidas por el especialista en el arte. Las células CLDN–positivas fueron seleccionadas con FACS usando subclones HEK–293T de alta expresión, que también fueron fuertemente positivos para GFP.

Ejemplo 3

Generación de anticuerpos anti–CLDN

Dado que CLDN6 es más homóloga respecto de CLDN4 y CLDN9 (véase la FIG. 2A y el análisis que se describe en el Ejemplo 2, más arriba), se usó CLDN6 como el inmunógeno con el cual generar anticuerpos anti–CLDN multirreactivos. Los ratones fueron inoculados con células HEK–293T o células

3T3 que sobreexpresaban hCLDN6 (generadas como se describe en el Ejemplo 2) a fin de producir hibridomas generadores de anticuerpos. Seis ratones (dos de cada una de las siguientes cepas: Balb/c, CD-1, FVB) fueron inoculados con 1 millón de células hCLDN6-HEK-293T emulsionadas con igual volumen de adyuvante TiterMax[®]. Se realizó una segunda inoculación separada de seis ratones (dos de cada una de las siguientes cepas: Balb/c, CD-1, FVB) usando células 3T3 que sobreexpresaban CLDN6. Luego de la inoculación inicial, los ratones fueron inyectados dos veces por semana durante 4 semanas con células que sobreexpresaban CLDN6 emulsionada con igual volumen de adyuvante de aluminio.

Los ratones fueron sacrificados, y los ganglios linfáticos de drenado (poplíteos, inguinales e ilíacos mediales) fueron disecados y usados como fuente de células productoras de anticuerpos. Una suspensión de células simples de células B (305×10^6 células) se fusionó con células de mieloma no secretantes P3x63Ag8.653 (ATCC #CRL-1580) en una proporción 1:1 por electrofusión celular usando un sistema BTX Hybrimmune modelo(BTX Harvard Apparatus). Las células se resuspendieron en medio de selección de hibridoma: medio DMEM (Cellgro) suplementado con azaserina (Sigma), 15% suero fetal clon I (Hyclone), 10% BM condimed (Roche Applied Sciences), 1 mM piruvato de sodio, 4 mM L-glutamina, 100 UI penicilina-estreptomicina, 50 μ M 2-mercaptoetanol y 100 μ M hipoxantina, y se cultivaron en tres matraces T225 en 90 ml de medio de selección por matraz. Los matraces se colocaron en una incubadora humidificada a 37°C que contenía 5% CO₂ y 95% aire durante 6 días. La biblioteca se congeló en 6 viales de búfer CryoStor CS10 (BioLife Solutions), con aproximadamente 15×10^6 células viables por vial, y se almacenaron en nitrógeno líquido.

Un vial de la biblioteca se descongeló a 37°C, y las células de hibridoma congeladas se agregaron a 90 ml de medio de selección de hibridoma, descrito antes, y se colocaron en un matraz T150. Las células se cultivaron hasta el día

siguiente en una incubadora humidificada a 37°C con 5% CO₂ y 95% aire. Al día siguiente, se recolectaron células de hibridoma del matraz y se colocaron en placas a razón de una célula por cavidad (usando un clasificador de células FACS Aria I) en 200 µl de medio de selección de hibridoma suplementado en 48 placas de fondo en U y 96 cavidades Falcon. Los hibridomas se cultivaron durante 10 días, y los sobrenadantes se analizaron para detectar anticuerpos específicos para proteínas hCLDN6, hCLDN4 o hCLDN9 usando citometría de flujo. La citometría de flujo se realizó de la siguiente manera: 1 x 10⁵ por cavidad de células HEK-293T, establemente transducidas con vectores lentivirales que codifican hCLDN6, hCLDN4 o hCLDN9, fueron incubadas durante 30 minutos con 100 µl de sobrenadante de hibridoma. Las células se lavaron con PBS/2% FCS y luego se incubaron con 50 µl por muestra de IgG de cabra anti-ratón marcada con DyeLight 649, anticuerpo secundario específicos de fragmento Fc diluido a razón de 1:200 en PBS/2%FCS. Al cabo de 15 min. de incubación, las células se lavaron dos veces con PBS/2%FCS y se resuspendieron en PBS/2%FCS con DAPI (para detectar células muertas) y se analizaron por citometría de flujo para detectar fluorescencia que excediera la de las células teñidas con un anticuerpo de control de isotipo. Los hibridomas seleccionados que dieron positivo para anticuerpos dirigidos a uno o varios de los antígenos CLDN se reservaron para su posterior caracterización. Las células de la biblioteca de hibridoma remanentes no usadas se congelaron en nitrógeno líquido para la futura evaluación y detección de biblioteca.

Ejemplo 4

Secuenciación de anticuerpos anti-CLDN

Los anticuerpos anti-CLDN se generaron como se describió antes y luego se secuenciaron de la siguiente manera. El ARN total se purificó a partir de células de hibridoma seleccionadas usando el RNeasy Miniprep Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron entre 10⁴ y 10⁵ células

por muestra. Las muestras de ARN aislado se almacenaron a -80°C hasta su uso. La región variable de la Ig de cadena pesada de cada hibridoma se amplificó usando dos mezclas de cebadores 5' que comprenden 86 cebadores de secuencia líder específicos de ratón diseñados para apuntar al repertorio VH de ratón completo en combinación con un cebador Cy 3' de ratón específico para todos los isotipos de IgG de ratón. De manera similar, dos mezclas de cebadores que contienen 64 secuencias líder 5' VK diseñadas para amplificar cada una de las familias VK de ratón se usaron en combinación con un único cebador inverso específico para la región constante kappa de ratón a fin de amplificar y secuenciar la cadena liviana kappa. Los transcriptos VH y VL se amplificaron a partir de 100 ng de ARN total usando el kit Qiagen One Step RT-PCR de la siguiente manera. Se realizó un total de cuatro reacciones RT-PCR para cada hibridoma, dos para la cadena liviana VK y dos para la cadena pesada VH. Las mezclas de reacción de PCR incluyeron 1,5 μl de ARN, 0,4 μl de 100 μM de cebadores de cadena pesada o cadena liviana kappa (sintetizados a medida por IDT), 5 μl de 5 x búfer de RT-PCR, 1 μl de dNTPs y 0,6 μl de mezcla de enzimas que contenía transcriptasa inversa y ADN polimerasa. El programa de ciclador térmico incluyó los siguientes pasos: paso de RT 50°C durante 60 min., 95°C durante 15 min., seguido por 35 ciclos de ($94,5^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos, 57°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 min.), y una incubación final a 72°C durante 10 min. Los productos de PCR extraídos se secuenciaron usando los mismos cebadores de región variable específicos como se describió antes. Los productos de PCR se enviaron a un proveedor de secuenciación externo (MCLAB) para los servicios de purificación y secuenciación por PCR.

La FIG. 3A muestra las secuencias de aminoácidos contiguas de varias nuevas regiones variables de cadena liviana de ratón de anticuerpos anti-CLDN (SEQ ID NOS: 21–57, números impares). La FIG. 3B muestra las secuencias de aminoácidos contiguas de nuevas regiones variables de cadena liviana de

ratón de los mismos anticuerpos anti-CLDN (SEQ ID NOS: 23–59, números impares). Las secuencias de ácido nucleico de región variable de cadena liviana y pesada de ratón se proporcionan en la FIG. 3C (SEQ ID NOS: 20–58, números pares). Tomadas juntas, las FIGS. 3A y 3B proporcionan las secuencias anotadas de 10 anticuerpos anti-CLDN de ratón, denominados SC27.1, SC27.22, SC27.103, SC27.104, SC27.105, SC27.106, SC27.108 (idéntico a SC27.109), SC27.201, SC27.203 y SC27.204. Las secuencias de aminoácidos se anotan para identificar las regiones de marco (es decir, FR1 – FR4) y las regiones determinantes de complementariedad (es decir, CDRL1 – CDRL3 en la FIG. 3A o CDRH1 – CDRH3 en la FIG. 3B), definidas según Kabat. Las secuencias de región variable se analizaron usando una versión registrada de la base de datos Abysis para proporcionar las designaciones CDR y FR. Aunque las CDR se numeran de acuerdo con Kabat, el especialista en el arte apreciará que las designaciones de CDR y FR también se pueden definir de acuerdo con Chothia, McCallum o cualquier otro sistema de nomenclatura aceptado.

Las SEQ ID NOS de cada anticuerpo particular son números impares secuenciales. Por ende, el anticuerpo monoclonal anti-CLDN, SC27.1, comprende los aminoácidos de SEQ ID NOS: 21 y 23 para la VL y VH, respectivamente; y SC27.22 comprende SEQ ID NOS: 25 y 27, etc. Las correspondientes secuencias de ácido nucleico para cada secuencia de aminoácidos del anticuerpo se incluyen en la FIG. 3C y tienen el SEQ ID NO inmediatamente antes de la correspondiente SEQ ID NO del aminoácido. Así, por ejemplo, los SEQ ID NOS de las secuencias de ácido nucleico de la VL y VH del anticuerpo SC27.1 son SEQ ID NOS: 20 y 22, respectivamente.

Ejemplo 5

Generación de anticuerpos anti-CLDN quiméricos y humanizados

Los anticuerpos anti-CLDN quiméricos se generaron usando técnicas reconocidas en el arte de la siguiente manera. El ARN total se extrajo de los hibridomas productores de anticuerpos anti-CLDN usando técnicas bioquímicas estándar, y el ARN se amplificó por PCR. Los datos sobre segmentos génicos V, D y J de las cadenas VH y VL de los anticuerpos de ratón se obtuvieron a partir de las secuencias de ácido nucleico de los anticuerpos anti-CLDN de la invención (véase la FIG. 3C para las secuencias de ácido nucleico). Las series de cebadores específicos para la secuencia marco de la cadena VH y VL de los anticuerpos se diseñaron usando los siguientes sitios de restricción: AgeI y XhoI para los fragmentos VH, y XmaI y DraIII para los fragmentos VL. Los productos de PCR se purificaron con un kit de purificación de PCR Qiaquick (Qiagen), seguido por la digestión con enzimas de restricción AgeI y XhoI para los fragmentos VH y XmaI y DraIII para los fragmentos VL. Los productos de PCR digeridos por VH y VL se purificaron y ligaron en vectores de expresión IgH o IgK, respectivamente. Se realizaron reacciones de ligado en un volumen total de 10 µl con 200 U de T4-ADN Ligasa (New England Biolabs), 7,5 µl de producto de PCR gen-específico digerido y purificado, y 25 ng de ADN de vector linealizado. Las bacterias DH10B de *E. coli* competentes (Life Technologies) se transformaron por shock térmico a 42°C con 3 µl de producto de ligado y se colocaron en placas de ampicilina en una concentración de 100 µg/ml. Luego de la purificación y digestión de los productos de ligado amplificados, el fragmento VH se clonó en los sitios de restricción AgeI-XhoI del vector de expresión pEE6.4 (Lonza) que comprende HulgG1 (pEE6.4HulgG1), y el fragmento VL se clonó en los sitios de restricción XmaI-DraIII del vector de expresión pEE12.4 (Lonza) que comprende una región constante liviana kappa humana (pEE12.4Hu-Kappa).

Los anticuerpos quiméricos se expresaron por co-transfección de células HEK-293T o CHO-S con vectores de expresión pEE6.4HulgG1 y pEE12.4Hu-Kappa. Antes de la transfección, las células HEK-293T se cultivaron en placas de 150 mm en condiciones estándar en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% FCS termo-inactivado, 100 µg/ml de estreptomicina y 100 U/ml de penicilina G. Para las transfecciones transitorias, las células se cultivaron hasta un 80% de confluencia. Se agregó 2,5 µg de cada uno de ADN vector pEE6.4HulgG1 y pEE12.4Hu-Kappa a 10 µl de reactivo de transfección HEK-293T en 1,5 ml de Opti-MEM. La mezcla se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente y se agregó a las células. Los sobrenadantes se cosecharon de tres a seis días después de la transfección. Para las células CHO-S, se agregó 2,5 µg de cada uno de ADN vector pEE6.4HulgG1 y pEE12.4Hu-Kappa a 15 µg de reactivo de transfección PEI en 400 µl de Opti-MEM. La mezcla se incubó durante 10 min. a temperatura ambiente y se agregó a las células. Los sobrenadantes se cosecharon de tres a seis días después de la transfección. Se eliminaron los desechos celulares de los sobrenadantes cultivados que contenían anticuerpos quiméricos recombinantes por centrifugación a 800×g durante 10 min. y se almacenaron a 4°C. Los anticuerpos quiméricos recombinantes se purificaron con perlas de proteína A.

Los anticuerpos anti-CLDN de ratón fueron humanizados usando un método registrado de injerto de CDR asistido por computadora (Abysis Database, UCL Business) y técnicas estándar de ingeniería molecular de la siguiente manera. Las regiones de marco humanas de las regiones variables se diseñaron sobre la base de la mayor homología entre las secuencias de marco y las estructuras canónicas de CDR de secuencias de anticuerpos germinales humanos, y las secuencias de marco y CDR de los anticuerpos de ratón relevantes. A los fines del análisis, la asignación de aminoácidos a cada uno de los dominios de CDR se realizó de acuerdo con la numeración de Kabat. Una vez que las regiones

variables fueron seleccionadas, se generaron a partir de segmentos de genes sintéticos (Integrated ADN Technologies). Los anticuerpos humanizados se clonaron y expresaron usando los métodos moleculares descritos antes para anticuerpos quiméricos.

Las secuencias VL y VH de aminoácidos de los anticuerpos humanizados fueron derivadas de las secuencias VL y VH del correspondiente anticuerpo de ratón (por ejemplo, hSC27.1 se deriva de SC27.1 de ratón). No se hicieron cambios de marcos ni retromutaciones en las regiones variables de cadena liviana o pesada de los cuatro anticuerpos humanizados generados: hSC27.1, hSC27.22, hSC17.108 y hSC27.204.

Para tratar las cuestiones de estabilidad, se produjeron tres variantes de hSC27.22 usando diferentes marcos de VH de la misma familia VH1. Las variantes se denominaron hSC27.22–VH1–8; hSC27.22–VH1–46; hSC27.22–VH1–69. Asimismo, se construyó una variante de hSC27.108, denominada hSC27.108v1, que comparte la misma cadena pesada que hSC27.108 (SEQ ID NO: 119) pero difiere en la cadena liviana en comparación con hSC27.108. Además, se generaron varias variantes de hSC27.204, denominadas hSC27.204v1 a hSC27.204v15, todas las cuales comparten la misma cadena liviana (SEQ ID NO: 120) pero difieren en la cadena pesada. Las cadenas pesadas de hSC27.204 y hSC27.204v4 difieren en una única mutación de región de marco, T28D. hSC27.204v1 a hSC27.204v3 y hSC27.204v5 a hSC27.204v7 incorporan mutaciones conservadoras en las CDR para tratar las cuestiones de estabilidad. Específicamente, hSC27.204v1, hSC27.204v2 y hSC27.204v3 contienen las modificaciones N58K, N58Q y T60N, respectivamente, en el entorno de cadena pesada de hSC27.204. De manera similar, hSC27.204v5, hSC27.204v6 y hSC27.204v7 contienen las modificaciones N58K, N58Q y T60N, respectivamente, en el entorno de hSC27.204v4. Por último, las variantes hSC27.204v8 y hSC27.204v9 no incluyen una retro-mutación en la posición 93 de la cadena pesada a fin de

minimizar la inmunogenicidad. Específicamente, las variantes hSC27.204v8, hSC27.204v9, hSC27.204v10, hSC27.204v11, hSC27.204v12, hSC27.204v13, hSC27.204v14 y hSC27.204v15 corresponden a las variantes hSC27.204, hSC27.204v1, hSC27.204v2, hSC27.204v3, hSC27.204v4, hSC27.204v5, hSC27.204 6 y hSC27.204v7, respectivamente, excepto que las variantes 8–15 carecen de la retro-mutación A93T.

Asimismo, se construyeron 9 variantes de la región constante del anticuerpo humanizado hSC27.22. La primera variante, hSC27.22ss1, es una variante sitio-específica y se describe en mayor detalle en el Ejemplo 8 a continuación. Las otras variantes fueron construidas sustituyendo el isotipo IgG por IgG2 (denominada “hSC27.22 IgG2”) o formas mutadas de IgG4 (denominadas “hSC27.22 IgG4 R409K”; “hSC27.22 IgG4 S228P”; “hSC27.22 IgG4 S228P K370E R409K”; “hSC27.22 IgG4 K370E”; “hSC27.22 IgG4 S228P K370E”; “hSC27.22 IgG4 C127S S228P”; “hSC27.22 IgG4 C127S K370E”; y “hSC27.22 IgG4 C127S S228P K370E”). La Tabla 4 a continuación muestra una síntesis de los anticuerpos anti-CLDN humanizados y sus variantes, con cambios de residuos numerados de acuerdo con Kabat *et al.*

En cada caso, la afinidad de unión del anticuerpo humanizado fue verificada para asegurar que fuera sustancialmente equivalente al correspondiente anticuerpo de ratón. La FIG. 3A muestra las secuencias de aminoácidos contiguas de la VL de anticuerpos humanizados ilustrativos y sus variantes. La FIG. 3B muestra las secuencias de aminoácidos contiguas de la VH de anticuerpos humanizados ilustrativos y sus variantes. Las secuencias de ácido nucleico de las regiones variables de cadena liviana y pesada de los anticuerpos anti-CLDN humanizados se proporcionan en la FIG. 3C.

TABLA 4

mAb	Isotipo	VH humana	hJH	Cambios VH FR	Cambios VH CDR	VK humana	hJK	Cambios VK FR	Cambios VK CDR
hSC27.1	IgG1	IGHV1–3*01	JH1	Ninguno	Ninguno	IGKV1–12*01	JK2	Ninguno	Ninguno
hSC27.22	IgG1	IGHV1–3*01	JH6	Ninguno	Ninguno	IGKV4–1*01	JK2	Ninguno	Ninguno
hSC27.22 ss1	IgG1 C220S	IGHV1–8*01	JH6	Ninguno	Ninguno	IGKV4–1*01	JK2	Ninguno	Ninguno
hSC27.22 –VH1–8	IgG1	IGHV1–8*01	JH6	Ninguno	Ninguno	IGKV4–1*01	JK2	Ninguno	Ninguno
hSC27.22 VH1–46	IgG1	IGHV1–46*01	JH6	Ninguno	Ninguno	IGKV4–1*01	JK2	Ninguno	Ninguno
hSC27.22 VH1–69	IgG1	IGHV1–69*01	JH6	Ninguno	Ninguno	IGKV4–1*01	JK2	Ninguno	Ninguno
hSC27.22 IgG2	IgG2	IGHV1–3*01	JH6	Ninguno	Ninguno	IGKV4–1*01	JK2	Ninguno	Ninguno
hSC27.22 IgG4 R409K	IgG4 R409K	IGHV1–3*01	JH6	Ninguno	Ninguno	IGKV4–1*01	JK2	Ninguno	Ninguno
hSC27.22 IgG4 S228P	IgG4 S228P	IGHV1–3*01	JH6	Ninguno	Ninguno	IGKV4–1*01	JK2	Ninguno	Ninguno
hSC27.22 IgG4 S228P K370E R409K	IgG4 S228P R409K K370E	IGHV1–3*01	JH6	Ninguno	Ninguno	IGKV4–1*01	JK2	Ninguno	Ninguno
hSC27.22 IgG4 K370E	IgG4 K370E	IGHV1–3*01	JH6	Ninguno	Ninguno	IGKV4–1*01	JK2	Ninguno	Ninguno
hSC27.22 IgG4 S228P K370E	IgG4 S228P K370E	IGHV1–3*01	JH6	Ninguno	Ninguno	IGKV4–1*01	JK2	Ninguno	Ninguno
hSC27.22 IgG4 C127S S228P	IgG4 C127S S228P	IGHV1–3*01	JH6	Ninguno	Ninguno	IGKV4–1*01	JK2	Ninguno	Ninguno
hSC27.22	IgG4	IGHV1–	JH6	Ninguno	Ninguno	IGKV4–	JK2	Ninguno	Ninguno

IgG4 C127S K370E	C127S K370E	3*01				1*01			
hSC27.22 IgG4 C127S S228P K370E	IgG4 C127S S228P K370E	IGHV1– 3*01	JH6	Ninguno	Ninguno	IGKV4– 1*01	JK2	Ninguno	Ninguno
hSC27.10 8	IgG1	IGHV1– 18*01	JH1	Ninguno	Ninguno	IGKV3– 11*01	JK4	Ninguno	Ninguno
hSC27.10 8 v1	IgG1	IGHV1– 18*01	JH1	Ninguno	Ninguno	IGKV6– 21*01	JK4	L47W K49Y	Ninguno
hSC27.20 4	IgG1	IGHV3– 23*01	JH1	A93T K94G	Ninguno	IGKV1– 16*01	JK4	Ninguno	Ninguno
hSC27.20 4 v1	IgG1	IGHV3– 23*01	JH1	A93T K94G	N58K	IGKV1– 16*01	JK4	Ninguno	Ninguno
hSC27.20 4v2	IgG1	IGHV3– 23*01	JH1	A93T K94G	N58Q	IGKV1– 16*01	JK4	Ninguno	Ninguno
hSC27.20 4v3	IgG1	IGHV3– 23*01	JH1	A93T K94G	T60N	IGKV1– 16*01	JK4	Ninguno	Ninguno
hSC27.20 4v4	IgG1	IGHV3– 23*01	JH1	T28D, A93T K94G	Ninguno	IGKV1– 16*01	JK4	Ninguno	Ninguno
hSC27.20 4v5	IgG1	IGHV3– 23*01	JH1	T28D, A93T K94G	N58K	IGKV1– 16*01	JK4	Ninguno	Ninguno
hSC27.20 4v6	IgG1	IGHV3– 23*01	JH1	T28D, A93T K94G	N58Q	IGKV1– 16*01	JK4	Ninguno	Ninguno
hSC27.20 4v7	IgG1	IGHV3– 23*01	JH1	T28D, A93T K94G	T60N	IGKV1– 16*01	JK4	Ninguno	Ninguno
hSC27.20 4v8	IgG1	IGHV3– 23*01	JH1	K94G	Ninguno	IGKV1– 16*01	JK4	Ninguno	Ninguno
hSC27.20 4v9	IgG1	IGHV3– 23*01	JH1	K94G	N58K	IGKV1– 16*01	JK4	Ninguno	Ninguno
hSC27.20 4v10	IgG1	IGHV3– 23*01	JH1	K94G	N58Q	IGKV1– 16*01	JK4	Ninguno	Ninguno
hSC27.20 4v11	IgG1	IGHV3– 23*01	JH1	K94G	T60N	IGKV1– 16*01	JK4	Ninguno	Ninguno
hSC27.20 4v12	IgG1	IGHV3– 23*01	JH1	T28D, K94G	Ninguno	IGKV1– 16*01	JK4	Ninguno	Ninguno
hSC27.20 4v13	IgG1	IGHV3– 23*01	JH1	T28D, K94G	N58K	IGKV1– 16*01	JK4	Ninguno	Ninguno

hSC27.20 4v14	IgG1	IGHV3– 23*01	JH1	T28D, K94G	N58Q	IGKV1– 16*01	JK4	Ninguno	Ninguno
hSC27.20 4v15	IgG1	IGHV3– 23*01	JH1	T28D, K94G	T60N	IGKV1– 16*01	JK4	Ninguno	Ninguno

Se apreciará que cada uno de los mencionados anticuerpos, o fragmentos inmunorreactivos de ellos, se pueden usar para proporcionar dominios de unión CAR CLDN de acuerdo con la presente divulgación.

Ejemplo 6

Especificidad de anticuerpos anti-CLDN

Los anticuerpos de ratón generados como se describe en el Ejemplo 3 se caracterizaron para determinar si reaccionaban en forma cruzada con los miembros de la familia CLDN y ortólogos de los miembros de la familia CLDN. Se realizaron análisis por citometría de flujo de la siguiente manera: las células HEK–293T fueron establemente transducidas con (i) vectores lentivirales que codifican hCLDN6, mCLDN6 y rCLDN6; (ii) hCLDN9; o (iii) hCLDN4, mCLDN4 y rCLDN4, preparados como se describe en el Ejemplo 4 anterior. 1×10^5 células HEK–293T establemente transducidas con los constructos de expresión antes mencionados se incubaron a 4°C durante 30 minutos con anticuerpos hSC27.1 o hSC27.22, diluidos hasta 10 µg/ml para obtener un volumen final de 50 µl PBS/2%FCS. Luego de la incubación, las células se lavaron con 200 µl de PBS/2%FCS, se peletizaron por centrifugación, el sobrenadante se descartó, y los pellets celulares se resuspendieron en 50 µl por muestra de anticuerpo secundario específico de fragmento Fc IgG de cabra anti-ratón marcado con DyeLight 649 diluido a razón de 1:200 en PBS/2%FCS. Luego de una incubación de 15 minutos a 4°C, las células se lavaron y se peletizaron dos veces con PBS/2%FCS como se describió previamente y se resuspendieron en 100 µl de PBS/2%FCS con 2 µg/ml de 4',6–diamidino–2–fenilindol diclorhidrato (DAPI). Las muestras se analizaron por citometría de flujo, y las células vivas se evaluaron con DyeLight 649 para detectar una fluorescencia que excediera

la de las células teñidas con un anticuerpo de control de isotipo.

El ensayo de citometría de flujo descrito antes dio como resultado la identificación de numerosos anticuerpos anti-CLDN. La reactividad cruzada se determinó sobre la base del cambio en la intensidad de la fluorescencia por media geométrica (Δ MFI) para la unión del anticuerpo con las líneas celulares que específicamente sobreexpresan el miembro indicado de la familia CLDN versus la señal determinada usando un control de isotipo de fluorescencia menos uno (FMO) (figura gris llena) (FIG. 4A). Así, ambos anticuerpos de unión a hCLDN6 SC27.1 y SC27.22 se pueden describir como anticuerpos multirreactivos a claudina, ya que reaccionan en forma cruzada en este ensayo con tres miembros de la familia de CLDN humana: hCLDN6, hCLDN4 y hCLDN9. Los anticuerpos SC27.1 y SC27.22 también se unieron a ortólogos de CLDN4 y CLDN9 de ratón y rata (datos no mostrados).

Para evaluar la capacidad de diversos anticuerpos de ratón adicionales para unirse con miembros de la familia CLDN, se realizó una citometría de flujo usando líneas celulares que sobreexpresan CLDN4, CLDN6 o CLDN9 humanas que habían sido incubadas con 10 μ g/ml de anticuerpo anti-CLDN primario purificado, o un anticuerpos de control IgG2b de ratón, seguido por la incubación con un anticuerpo secundario Alexa 647 anti-ratón. Como se muestra en la FIG. 4B, todos los anticuerpos se unieron a CLDN6, mientras que algunos fueron CLDN6-específicos (por ejemplo, SC27.102, SC27.105 y SC27.108), y otros fueron multirreactivos y se unieron a CLDN6 y CLDN9 (por ejemplo, SC27.103 y SC27.204), o a CLDN6 y CLDN4 (por ejemplo, SC27.104). Por ende, se obtuvo un amplio rango de perfiles de unión multirreactivos para los anticuerpos de la invención.

Para comparar la afinidad de unión aparente de los anticuerpos anti-CLDN multirreactivos por CLDN6 y CLDN9, se realizó una citometría de flujo con una dilución en serie del anticuerpo anti-CLDN humanizado hSC27.22. El anticuerpo se diluyó en serie hasta concentraciones entre 50 pg/ml y 100 μ g/ml,

y se agregó a una placa de 96 cavidades que contenía células HEK–293T que sobreexpresaban CLDN6 o CLDN9, y se mantuvo sobre hielo durante una hora. Se agregó un anticuerpo anti–humano secundario (Jackson ImmunoResearch Cat. Nro. 109–605–098) y se incubó durante una hora en la oscuridad. Las células se lavaron dos veces en PBS, tras lo cual se añadió Fixable Viability Dye (eBioscience Cat. Nro. 65–0863–14) durante 10 minutos. Luego del lavado adicional con PBS, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) y se leyeron en un citómetro de flujo BD FACS Canto II de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores de MFI se normalizaron usando microesferas fluorescentes (Bangs Laboratories) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores de MFI máximos normalizados observados para la unión del anticuerpo con células que expresan ya sea CLDN6 o CLDN9 se usaron para transformar los datos en la unión máxima de fracción para cada célula sobreexpresante, usando la ecuación: unión máxima de fracción = (MFI normalizado observado / MFI normalizado máximo). Los valores de EC50 aparentes para la unión de hSC27.22 con cada línea celular luego se calcularon usando un ajuste de curva de pendiente variable y cuatro parámetros para un modelo log (inhibidor) vs. respuesta suministrado en el paquete de software GraphPad Prism (La Jolla, CA). La FIG. 4C muestra que el anticuerpo anti–CLDN6 humanizado multirreactivo, hSC27.22, tiene una EC50 aparente por CLDN6 que es sustancialmente igual a aquella por CLDN9 (EC50 aparente CLDN6 – 3,45 µg/ml (r^2 para calidad de ajuste = 0,9987, límites de confianza del 99%: 2,51 – 4,75 µg/ml); EC50 aparente CLDN9 – 4,66 µg/ml (r^2 para calidad de ajuste = 0,9998, límites de confianza del 99%: 4,09 – 5,31 µg/ml)). Por consiguiente, los dominios de unión de los CAR divulgados se pueden adaptar para asociarse con proteínas CLDN seleccionadas (por ejemplo, CLDN6) o con combinaciones de proteínas CLDN (por ejemplo, CLDN6 y CLDN9) dependiendo del índice terapéutico deseado.

Ejemplo 7

Generación de receptores quiméricos de antígeno anti-CLDN

Fabricación de un CAR anti-CD19

Para generar un constructo de CAR de control positivo, se sintetizó un marco de lectura abierto sintético que codifica un CAR de segunda generación dirigido contra CD19 humana (véase US2014/0271635) (Life Technologies) y se subclonó en el sitio de clonación múltiple (MCS) del vector de expresión lentiviral pCDH-CMV-MCS-EF1-GFP-T2A-Puro (System Biosciences, Mountain View CA). La expresión del constructo de CAR CD19 luego es impulsada por el promotor CMV, mientras que el marco de lectura abierto bicistrónico GFP-T2A-Puro permite la detección de células transducidas por análisis de la expresión de GFP (por ejemplo, microscopia o FACS) y la selección de células usando el antibiótico puromicina. El marco de lectura abierto de CAR anti-CD19 comprende nucleótidos, de 5' a 3', que codifican la secuencia líder de señal desde la cadena alfa CD8 humana (aminoácidos 1 – 21, UniProt acceso P01732–1), un scFv derivado de un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce CD19 humana (Nicholson *et al*, 1997; PMID 9566763), la bisagra alfa CD8 humana, dominio transmembrana y región proximal (aminoácidos 138 – 206, UniProt acceso P01732–1), la región de señalización coestimuladora intracelular desde la proteína 4-1BB humana (aminoácidos 214–255, UniProt acceso Q07011–1) y la región de señalización intracelular de cadena CD3 ζ humana (aminoácidos 52 – 164, UniProt acceso P20963–1). Además de proporcionar un control positivo, el CAR anti-CD19 /vector de expresión lentiviral fue diseñado con sitios de restricción, de modo tal que el componente scFv anti-CD19 pueda removerse fácilmente y sustituirse por un componente de región de unión alternativa dirigido a cualquier determinante seleccionado. Como se describe a continuación, este sistema de casete mostrado en la FIG. 5 (SCT1–XX, donde XX indica el componente particular de dominio de unión de CLDN) fue usado para validar diversas formas de

realización de la presente invención. Nótese que la nomenclatura SCT puede, dependiendo del contexto, referirse a la proteína CAR anti-CLDN expresada, a linfocitos citotóxicos que expresan la proteína CAR, el ORF de CAR anti-CLDN o un vector de expresión (por ejemplo, lentiviral, retroviral, plásmido, etc.) que comprende el mismo ORF dependiendo del contexto.

Fabricación de SCT1-h27.108

Para generar un nuevo constructo de CAR anti-CLDN (SCT1-h27.108), una secuencia de nucleótidos que codifica un segmento scFv se sintetizó primero uniendo operativamente secuencias de nucleótidos anti-hSCh27.108 VL (SEQ ID NO 68) y VH (SEQ ID NO 70) juntas a través de un ligador multímero pentamérico GlyGlyGlyGlySer (G₄S)₃ (GGGGSGGGGSGGGGS; SEQ ID NO 3) para proporcionar una secuencia de polinucleótidos hSC27.108-scFv:

```
GAAATCGTGCTTACACAATCCCCTGCCACTCTGAGCCTTTCTCCAGGCGA
GCGAGCAACCCTTTCTCTGCAGTGTTTCCTCTTCAATCAGTTCCAGCAATTT
GCACTGGTACCAGCAGAAGCCTGGTCAGGCACCCCGATTGTTGATCTATG
GCACATCTAACCTGGCCAGCGGCATCCCTGCTCGGTTCAGTGGATCTGGC
TCCGGAACAGATTTCACTCTCACTATCAGCTCCCTTGAGCCTGAAGATTTT
GCCGTGTACTACTGTCAGCAATGGAGTTCCTACCCCCACACCTTTGGCGG
CGGGACAAAGGTCGAGATAAAAGGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGG
AAGTGGCGGAGGGGGATCTCAGGTACAGCTGGTCCAGTCCGGCGCTGAG
GTTAAGAAGCCCGGTGCCTCCGTGAAGGTATCTTGTAAGGCCTCAGGTTA
CACCTTTACAAATTATCTGATCGAATGGGTGAGACAGGCCCCAGGTCAGG
GTCTGGAATGGATGGGACTCATCAACCCTGGGAGTGGCGGGACCAACTAC
AACGAAAAGTTTAAGGGGAGAGTGACAATGACCACAGATACCAGTACCTC
CACCGCATATATGGAGCTGCGAAGCTTGAGGTCCGATGACACTGCTGTGT
ACTATTGCGCCCGTAGAAGCCCACTCGGGTCTTGATCTATTACGCATAC
```

GATGGTGTGGCCTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTCTCCTCG
(SEQ ID NO 4)

que codifica la secuencia de aminoácidos presentada inmediatamente a continuación:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSVSSSISSSNLHWYQQKPGQAPRLLIYGTSN
LASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSYPHTFGGGTKVEI
KGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYLIE
WVRQAPGQGLEWMGLINPGSGGTNYNEKFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSL
RSDDTAVYYCARRSPLGSWIYYAYDGVAYWGQGLTVTVSS
(SEQ ID NO 5)

en donde el scFv comprende la secuencia de aminoácidos VL presentada en SEQ ID NO 69 y la secuencia de aminoácidos VH presentada en SEQ ID NO 71.

Usando técnicas estándar de ingeniería molecular, la secuencia de nucleótidos hSC27.108–scFv se clonó subsiguientemente en el casete SCT1 para proporcionar un vector de expresión lentiviral SCT1–h27.108 que comprende un CAR anti–CLDN. En tal sentido, el CAR SCT1–27.108 comprende un marco de lectura abierto que codifica los siguientes elementos de 5' a 3': región líder de cadena alfa CD8 (aminoácidos 1–21, UniProt P01732–1), dominio VL h27.108 (según el Ejemplo 5), secuencia ligadora sintética (G₄S)₃ (aminoácidos 1–15, Huston *et al.*, 1988), dominio VH h27.108 (según el Ejemplo 5), la bisagra alfa CD8 humana y dominio transmembrana (aminoácidos 138 – 206, UniProt acceso P01732–1), la región de señalización coestimuladora intracelular de la proteína 4–1BB humana (aminoácidos 214–255, UniProt acceso Q07011–1) y la región de señalización intracelular de cadena CD3 ζ humana (aminoácidos 52 – 164, UniProt acceso P20963–1). El

marco de lectura abierto de CAR fue confirmado en cuanto a la secuencia. En la FIG. 5 se muestra un diagrama esquemático del marco de lectura abierto de CAR SCT1–h27.108, con la correspondiente secuencia de ácido nucleico presentada en la FIG. 6A (SEQ ID NO 8) y la resultante secuencia de aminoácidos presentada en la FIG. 6B (SEQ ID NO 9).

Fabricación de SCT1–h27.204 v2

Para generar un nuevo constructo de CAR anti–CLDN (SCT1–h27.204v2), una secuencia de nucleótidos que codifica un segmento scFv se sintetizó primero uniendo operativamente secuencias de nucleótidos anti–hSch27.204 VL (SEQ ID NO 72) y VH (SEQ ID NO 86) juntas a través de un ligador multímero pentamérico GlyGlyGlyGlySer (G₄S)₃ (GGGGSGGGGSGGGGS; SEQ ID NO 3) para proporcionar una secuencia de polinucleótidos hSC27.204v2–scFv:

```
GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCTGCTTCCGTGGGCGA
CAGAGTGACCATCACATGCAAGGCCGCCAGAACGTGGGCACCTCTGTG
GCCTGGTTCCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCCAAGTCCCTGATCTACTC
CGCCTCCTACAGATACTCCGGCGTGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCT
CTGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTC
GCCACCTACTACTGCCAGCAGTACATCACCTACCCCTACACCTTCGGCGG
AGGCACCAAGGTGGAAATCAAGGGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGG
AAGTGGCGGAGGGGGATCTGAAGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGA
CTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCTCCGGCTT
CACCTTCTCCCGGTACTGGATGTCCTGGGTGCGACAGGCTCCTGGCAAGG
GCCTGGAATGGGTGTCCGAGATCAACCCCGACTCCTCCACCATCCAGTAC
ACCCCCAGCCTGAAGGCCCGGTTACCATCTCTCGGGACAACCTCCAAGAA
CACCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTG
TACTACTGTACCGGCCCTGCTTATTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACCGT
```

GTCCTCT (SEQ ID NO. 6)

que codifica la secuencia de aminoácidos presentada inmediatamente a continuación:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKAGQNVGTSVAWFQQKPGKAPKSLIYSASY
RYSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYITYPYTFGGGKVEIK
GGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWM
SWVRQAPGKGLEWVSEINPDSSTIQYTPSLKARFTISRDN SKNTLYLQMNSLR
AEDTAVYYCTGPAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO. 7)

en donde el scFv comprende la secuencia de aminoácidos VL presentada en SEQ ID NO 73 y la secuencia de aminoácidos VH presentada en SEQ ID NO 87.

Usando técnicas estándar de ingeniería molecular, la secuencia de nucleótidos hSC27.204v2-scFv se clonó subsiguientemente en el casete SCT1 para proporcionar un vector de expresión lentiviral SCT1-h27.204v2 que comprende un CAR anti-CLDN. En tal sentido, el CAR SCT1-27.204v2 comprende un marco de lectura abierto que codifica los siguientes elementos de 5' a 3': región líder de cadena alfa CD8 (aminoácidos 1–21, UniProt P01732–1), dominio VL h27.204 (según el Ejemplo 5), secuencia ligadora sintética (G₄S)₃ (aminoácidos 1–15, Huston *et al.*, 1988), dominio VH h27.204v2 (según el Ejemplo 5), la bisagra alfa CD8 humana y dominio transmembrana (aminoácidos 138 – 206, UniProt acceso P01732–1), la región de señalización coestimuladora intracelular de la proteína 4-1BB humana (aminoácidos 214–255, UniProt acceso Q07011–1) y la región de señalización intracelular de cadena CD3 ζ humana (aminoácidos 52 – 164, UniProt acceso P20963–1). El marco de lectura abierto de CAR fue confirmado en cuanto a la secuencia. En la FIG. 5 se muestra un diagrama esquemático del marco de lectura abierto de CAR

SCT1–h27.204v2, con la correspondiente secuencia de ácido nucleico presentada en la FIG. 6C (SEQ ID NO 10) y la resultante secuencia de aminoácidos presentada en la FIG. 6D (SEQ ID NO 11).

Ejemplo 8

Generación y caracterización de las partículas de vector lentiviral

El empaquetado de vector lentiviral de SCT1–h27.108 y SCT1–h27.204v2 se llevó a cabo de la siguiente manera: 10 ug de plásmido SCT1–h27.108 o SCT1–h27.204v2, 7 ug de pΔR8,74 y 4 ug de pMD2.G se cotransfectaron en diez millones de células HEK–293T (ATCC) en presencia de polietilenimina (Polysciences) en una relación ADN : PEI de 1 : 4. Las células cotransfectadas se incubaron a 37°C (5% CO₂) hasta el día siguiente, seguido por el intercambio de medios al día siguiente. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, el medio de cultivo que contenía partículas lentivirales fue cosechado y enjuagado por centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C para remover los desechos celulares. Para peletizar las partículas del vector lentiviral, el medio de cultivo enjuagado se ultracentrifugó a 19500 rpm durante dos horas a 4°C. Tras la ultracentrifugación, el sobrenadante se descartó, el pellet viral se resuspendió en PBS estéril y se almacenó a –80°C. La cuantificación de los stocks de vector lentiviral recuperado se evaluó por p24 ELISA (Cell Biolabs), y la eficiencia de transferencia génica (titulación funcional) se evaluó mediante métodos estándar de titulación de vector lentiviral. Los rendimientos típicos de stocks de vector lentiviral oscilaron entre 7–15 ug/ml de antígeno p24, y las titulaciones funcionales oscilaron de 1–3 x 10e8 TU/ml. Los stocks de vectores lentivirales SCT1–h27.108 y SCT1–27.204v2 se congelaron y almacenaron hasta su uso.

Como se establece en los Ejemplos subsiguientes, los stocks de vectores se pueden usar para generar linfocitos sensibilizados e inducir una respuesta inmune deseada, como se analiza en detalle en toda la presente solicitud y se

muestra esquemáticamente en la FIG. 7 anexa a la presente.

Ejemplo 9

Generación de constructos CAR SCT1–h27.108 y SCT1–h27.204v2 que expresan linfocitos T

Se generaron linfocitos Jurkat CLDN blanco–específicos que expresan SCT1–h27.108 o SCT1–h27.204v2 transduciendo un millón de linfocitos T Jurkat E6–1 (ATCC) con el vector lentiviral SCT1–h27.108 o SCT1–h27.204v2 del Ejemplo previo a una multiplicidad de infección (MOI) de ~4 en presencia de 10 ug/ml de polibreno (EMD Millipore) para asegurar una eficiente transducción viral. Las células se dejaron incubar en presencia de partículas lentivirales durante 72 horas a 37°C (5% CO₂). Luego de ello, el medio usado se cambió por medio fresco que contenía 2 ug/ml de puomicina (Life Technologies) para seleccionar positivamente células que expresaban SCT1–h27.108 o SCT1–h27.204v2. Las células se dejaron incubar durante 5 días más en presencia de puomicina antes de inferir la presencia de scFv anti–CLDN sobre la superficie celular por citometría de flujo (FIG. 8A). Más particularmente, las células Jurkat transducidas que expresan SCT1–h27.108 o SCT1–h27.204v2 y las células de control no transducidas luego se peletizaron, se lavaron y se resuspendieron en búfer según se describe en la presente. Las preparaciones después se analizaron en un citómetro de flujo BD FACS Canto II, según las instrucciones del fabricante, para detectar la presencia de GFP, y por ende inferir la expresión del SCT1–h27.108 o SCT1–h27.204, según se evidencia en la FIG. 8A.

También se usó citometría de flujo para detectar la presencia de proteína hCLDN6 sobre la superficie de una línea celular HEK–293T modificada por ingeniería genética que sobreexpresa hCLDN6 (FIG. 8B), que se usan para caracterizar constructos CAR de la presente invención. En tal sentido, las células parentales HEK–293T o las células T HEK–293 que sobreexpresan hCLDN6 fueron cosechadas y aisladas en suspensiones de células únicas con

Versene (Life Technologies). Las células aisladas se lavaron como se describió antes y se incubaron durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad con 1 microgramo de anticuerpo anti-CLDN6 antes de lavar 3 veces en PBS/2% FCS. Las células luego se incubaron durante 30 minutos con 50 µl por muestra de anticuerpo secundario específico de fragmento Fc IgG de cabra anti-ratón marcado con AlexaFluor-647 (Life Technologies) diluido a razón de 1:200 en PBS/2%FCS, se lavaron 3 veces con PBS/2% FCS y se resuspendieron en PBS/2% FCS con DAPI (para detectar células vivas). Las células luego se analizaron en un citómetro de flujo BD FACS Canto II, según las instrucciones del fabricante, para proporcionar el conjunto de datos presentado en la FIG. 8B. Las FIGS. 8A y 8B, respectivamente, demuestran que SCT1-h27.108 y SCT1-h27.204v2 se expresan e linfocitos T Jurkat transducidos, pero no en células Jurkat no transducidas, y que la proteína CLDN6 humana se expresa en las células T HEK-293 modificadas por ingeniería genética, pero no en células HEK-293T-naïve.

Ejemplo 10

Los linfocitos T Jurkat-SCT1-h27.108 o SCT1-h27.204v2 inducen la producción de IL-2 tras el contacto con células que expresan hCLDN

Los linfocitos Jurkat-SCT1-h27.108 o SCT1-h27.204v2 transducidos fueron evaluados en cuanto a su actividad específica del blanco midiendo la inducción de IL-2, que es indicativa de la activación de células T mediada por CAR. Más específicamente, usando linfocitos Jurkat transducidos y células T 293 modificadas por ingeniería genética que expresan hCLDN6 del Ejemplo previo, se monitorearon los niveles de IL-2 para demostrar que los linfocitos que expresan CAR son activados y montan una respuesta inmune tras el contacto con células que expresan hCLDN6.

En tal sentido, los linfocitos Jurkat-SCT1-h27.108 o SCT1-h27.204v2 del Ejemplo 9 se co-cultivaron con células T HEK-293 modificadas genéticamente

para sobre-expresar antígeno hCLDN6 en la superficie celular, como se evidencia por citometría de flujo. El co-cultivo de linfocitos con células blanco HEK-293T-hCLDN se realizó en las relaciones descritas de linfocito a célula blanco (L:T) que se presentan en la FIG. 9A para evaluar la respuesta a la dosis y determinar las condiciones de producción máxima de IL-2. Los co-cultivos se incubaron a 37°C (5% CO₂) durante 48 horas, tras lo cual el medio se cosechó y se enjuagó de desechos celulares por centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante enjuagado se evaluó entonces en cuanto a la producción de IL-2 por ELISA (Thermo Scientific), según las instrucciones del fabricante. Para evaluar la producción de IL-2 de base, las células Jurkat no transducidas (Jurkat-naïve) fueron co-cultivadas con células HEK-293T-hCLDN.

Como lo evidencian los datos presentados en la FIG. 9B, los linfocitos Jurkat-SCT1-h27.108 o SCT1-h27.204v2 fueron instados a producir IL-2 de manera dependiente de la concentración tras la exposición a células que expresan hCLDN6. Dicha producción de IL-2 es indicativa de la activación de células T por el SCT1 CAR luego del reconocimiento del antígeno CLDN en células que expresan hCLDN6 (incluidas células tumorigénicas que expresan hCLDN). La activación específica mediada por CAR de células Jurkat se dilucida además por la falta de producción observable de IL-2 entre co-cultivos que contienen HEK-293T-CLDN y células Jurkat no transducidas (FIG.9B).

Como se mencionó previamente, el proceso para generar esta respuesta inmune deseada, según se analiza en detalle en toda la presente solicitud, se muestra esquemáticamente en la FIG. 7 anexa a la presente.

Ejemplo 11

Generación de linfocitos T que expresan constructos CAR SCT1-h27.108 o SCT1-h27.204v2

A fin de demostrar que los CAR divulgados se pueden usar para proporcionar

linfocitos sensibilizados, los linfocitos T CD3⁺ humanos primarios se aislaron de preparaciones de células mononucleares de sangre periférica disponibles en el comercio (PBMC: AllCells) usando un kit de selección positiva de CD3 humanas (Stemcell Technologies). Las PBMC se obtuvieron de dos donantes diferentes (donante 1 y donante 2).

Luego de la aislación, las células T CD3⁺ se cultivaron en medio RPMI que contenía 10% suero fetal bovino termo-inactivado (Hyclone), 1% penicilina/estreptomicina (Corning), 1% l-glutamina (Corning) y 10 mM HEPES (Corning). Los linfocitos T fueron incubados a 37°C (5% CO₂) en presencia de perlas de activación de CD3/CD28 (Dynabeads) en una proporción 1:5 para la activación. Se agregó IL-2 (Peprotech) cada 2 días, hasta una concentración final de 50 UI/ml. Veinticuatro horas después de la activación inicial, los linfocitos T blanco-específicos CLDN que expresaban SCT1-h27.108 o SCT1-h27.204v2 fueron generados transduciendo un millón de células T con vectores lentivirales SCT1-h27.108 o SCT1-h27.204v2 (generados sustancialmente como se establece en el Ejemplo 8) a una multiplicidad de infección (MOI) de ~5 en presencia de 10 ug/ml de polibreno (EMD Millipore) para asegurar una eficiente transducción viral. Las células se dejaron incubar en presencia de partículas lentivirales durante 72 horas a 37°C (5% CO₂) antes de evaluar la expresión anti-CAR CLDN en superficie por citometría de flujo (FIG. 10).

El análisis por citometría de flujo de linfocitos T transducidos que expresan SCT1-h27.108 o SCT1-h27.204v2 junto con células de control de linfocitos T que no tienen CAR se realizó de la siguiente manera: 10⁶ células de cada muestra fueron cosechadas y peletizadas por centrifugación a 1200 rpm a 4°C durante 5 minutos; el sobrenadante fue eliminado, y el pelet se lavó con PBS/2% FCS frío dos veces. Luego de que el sobrenadante del lavado final se eliminara, a fin de detectar directamente la presencia del CAR en la superficie de las células, el pelet celular se resuspendió en 100 microlitros de PBS/2% FCS que contenía 1 microgramo de anticuerpo F(ab') IgG de cabra anti-

humano Affinipure conjugado con Alexa Fluor® 647 (Jackson ImmunoResearch). Las células se incubaron en la oscuridad a 4°C durante 30 minutos. Luego de la incubación, las células se lavaron 3 veces con PBS/2% FCS antes de ser re-suspendidas en PBS/2% FCS con DAPI (para detectar células vivas). Las células luego se analizaron en un citómetro de flujo BD FACS Canto II, según las instrucciones del fabricante, para proporcionar los datos presentados en la FIG. 10.

La FIG. 10 muestra claramente que SCT1-h27.108 o SCT1-h27.204v2 se expresan ambos en linfocitos T primarios transducidos (es decir, linfocitos sensibilizados), pero no en linfocitos no transducidos.

Ejemplo 12

Generación y caracterización de células que expresan antígeno blanco CLDN

Como se establece en el Ejemplo 9, se usó citometría de flujo para detectar la presencia de proteína CLDN en la superficie de una línea celular HEK-293T modificada por ingeniería genética que sobreexpresa CLDN6 humana. De manera similar, se usó citometría de flujo para confirmar la expresión de CLDN humana en una línea celular tumoral de xenoinjerto derivado del paciente (PDX) (OV78). Tanto la línea celular 293T modificada artificialmente como la línea celular de cáncer de ovario derivada se pueden usar para caracterizar linfocitos sensibilizados de la presente invención.

Más particularmente, las células T HEK-293 que sobreexpresan CLDN6 humana (293T-CLDN) fueron cosechadas y aisladas en suspensiones de células únicas con Versene (Life Technologies). De manera similar, los tumores PDX OV78 recién cosechados se procesaron en suspensión de célula única usando un kit de disociación del tumor (Mylteni Biotec). Las células aisladas se lavaron según se describe en la presente y se incubaron durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad con 1 microgramo de anticuerpo anti-CLDN (SC27.22) o control de isotipo antes de lavar 3 veces con PBS/2% FCS. Las células luego

se incubaron durante 30 minutos con 50 microlitros por muestra de anticuerpo secundario específico de fragmento Fc IgG de cabra anti-ratón marcado con AlexaFluor-647 (Life Technologies) diluido a razón de 1:200 en PBS/2%FCS, se lavaron 3 veces con PBS/2% FCS y se resuspendieron en PBS/2% FCS con DAPI (para detectar células vivas). Las células luego se analizaron en un citómetro de flujo BD FACS Canto II, según las instrucciones del fabricante, para proporcionar el conjunto de datos presentado en las FIGS. 11A y 11B.

Los datos resultantes muestran que la proteína CLDN humana se expresa en las células T HEK-293 modificadas por ingeniería genética (FIG. 11A) y en las células tumorales OV78 PDX (FIG. 11B).

Ejemplo 13

Los linfocitos T SCT1-h27.108 o SCT1-h27.204v2 inducen la producción de citoquinas tras el contacto con células que expresan CLDN

Los linfocitos sensibilizados que comprenden SCT1-h27.108 o SCT1-h27.204v2 fueron evaluados en cuanto a la activación blanco-específica midiendo la inducción de IFN α y TNF γ tras el contacto con células blanco que expresan CLDN. Se apreciará que la producción de citoquinas (por ejemplo, inducción de TNF γ e IFN α) es indicativa de receptores quiméricos de antígeno activos que son capaces de inducir una respuesta inmune antitumoral.

Para evaluar la activación blanco-específica (es decir, CLDN), los linfocitos sensibilizados que comprenden células huésped de dos donantes diferentes fueron expuestos a células T CLDN+ 293 y a células de cáncer de ovario que expresan CLDN (ambas del Ejemplo 11). Más específicamente, se usaron preparaciones de PMBC de dos donantes diferentes (donante 1 y donante 2) para proporcionar preparaciones de linfocitos T CD3+ sustancialmente como se indicó antes. Las respectivas preparaciones de linfocitos luego se transdujeron con SCT1-h27.108 o SCT1-h27.204v2 sustancialmente como se establece en el Ejemplo 11, para proporcionar preparaciones de linfocitos sensibilidades CLDN del donante 1 y donante 2 (junto con linfocitos no transducidos como

controles). Cada una de las preparaciones de linfocitos sensibilizados (con controles) se co-cultivó con células blanco 293T–CLDN o OV78 PDX en una proporción efector a blanco (E:T) de 3:1. Los co-cultivos se incubaron a 37°C (5% CO₂) durante 48 horas, tras lo cual el medio se cosechó y se enjuagó de desechos celulares por centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante enjuagado luego se evaluó en cuanto a la producción de TNF γ por ELISA (Thermo Fisher) e IFN α por ELISA (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Las mediciones resultantes para los niveles de IFN α y TNF γ se muestran, respectivamente, en las FIGS. 12A y 12B (IFN α) y las FIGS. 13A y 13B (TNF γ). En ambos casos, la mayor producción de citoquinas es indicativa de una activación más robusta de poblaciones CAR⁺. Como evidencian los datos presentados en las FIGS. 12A (células 293) y 12B (células tumorales) y las FIGS. 13A (células 293) y 13B (células tumorales), los linfocitos T que tienen SCT1–h27.108 o SCT1–h27.204v2 fueron instados a producir TNF γ e IFN α tras la exposición a células modificadas por ingeniería genética y derivadas del tumor que expresan CLDN humana, mientras que los linfocitos T que no tienen CAR exhibieron una mínima inducción de TNF γ e IFN α cuando fueron co-cultivados con las mismas células blanco. Esto confirma que los linfocitos sensibles a CLDN de la presente invención son activos y capaces de generar señales inmunoestimuladoras tras la exposición a células tumorales CLDN⁺.

Ejemplo 14

Destrucción programada de células que expresan CLDN *in vitro* por linfocitos T SCT1–h27.108 o SCT1–h27.204v2

Para demostrar la capacidad de los linfocitos sensibles a CLDN para destruir células de manera blanco-específica, las células transducidas CAR de la presente invención se expusieron a células 293 modificadas genéticamente y células tumorales que expresaban CLDN (cada una del Ejemplo 12). Luego de la exposición, se calculó el número de células blanco vivas remanentes, y los

resultados se presentan en las FIGS. 14A (células 293) y 14B (células tumorales).

Más particularmente, los linfocitos sensibilizados SCT1–h27.108 o SCT1–h27.204v2 (preparados según el Ejemplo 11 con células huésped de dos donantes) se co–cultivaron con células 293T–CLDN o OV78 PDX en una proporción efector a blanco (E:T) de 3:1 (nótese que, debido a las condiciones de ensayo, las mediciones de la actividad de los linfocitos del donante 1 expuestos a células OV78 no fueron concluyentes). Los co–cultivos se incubaron a 37°C (5% CO₂) durante 48 horas, previo a la determinación de las células con CLDN viables restantes.

El porcentaje de células vivas se calculó de la siguiente manera: los co–cultivos fueron cosechados y lavados como se indica en la presente, previo a la incubación durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad con 1 microgramo de anticuerpo anti–CLDN o control de isotipo, seguido por 3 lavados con PBS/2% FCS. Las células luego se incubaron durante 30 minutos con 50 microlitros por muestra de anticuerpo secundario específico de fragmento Fc IgG de cabra anti–ratón marcado con AlexaFluor–647 (Life Technologies) diluido a razón de 1:200 en PBS/2% FCS. Las células se lavaron tres veces con PBS/2% FCS, seguido por la resuspensión en 200 microlitros de PBS/2% FCS que contenía DAPI (Life Technologies) para discriminación de la viabilidad celular, y 10000 perlas de recuento absoluto (Life Technologies) para la normalización de los recuentos celulares. El análisis y la enumeración de las células blanco con CLDN viables remanentes se realizó en un citómetro de flujo BD FACS Canto II cuantificando el respectivo número de células con CLDN viables por cada 7500 perlas de recuento absoluto recolectadas. El número de células blanco viables remanentes en presencia de linfocitos T sin CAR se usó como punto de referencia para comparar la destrucción blanco–específica de células con CLDN por parte de linfocitos sensibilizados SCT1–h27.108 o SCT1–h27.204v2. Como se muestra en las FIGS. 14A (células 293) y 14B (células tumorales), las

células 293T–CLDN6 exhibieron una significativa susceptibilidad a la citólisis por linfocitos T SCT1–h27.108 o linfocitos T SCT1–h27.204, con más del 70% de las células blanco eliminadas. Algo importante es que se demostraron resultados similares cuando los linfocitos T con CAR anti–CLDN6 se cultivaron en presencia de células tumorales OV78 PDX, en donde aproximadamente el 50% de las células OV78 fueron eliminadas. En general, estos datos demuestran la activación y destrucción de células que expresan CLDN6 por medio del reconocimiento CLDN6–específico por SCT1–h27.108 y SCT–h27.204 CAR.

El especialista en el arte apreciará además que la presente invención se puede poner en práctica en otras formas específicas, sin desviarse del espíritu o los atributos centrales de ella. Dado que la anterior descripción de la presente invención divulga sólo formas de realización ilustrativas de ella, se ha de entender que otras variaciones se encuentran contempladas dentro del alcance de la presente invención. Por consiguiente, la presente invención no se limita a las formas de realización particulares que se han descrito en detalle en la presente. En cambio, se debe hacer referencia a las reivindicaciones adjuntas como indicativas del alcance y contenido de la invención.