

10

20

25

Campo técnico

La presente invención hace referencia a composiciones y métodos mejorados para tratar afecciones relacionadas con células B. De forma más particular, la invención hace referencia a receptores
5 de antígenos quiméricos (CAR, por su sigla en inglés) mejorados que comprenden anticuerpos anti-BCMA de murino o fragmentos de unión al antígeno de estos, células efectoras inmunes genéticamente modificadas para expresar estos CAR y uso de estas composiciones para tratar de forma eficaz afecciones
10 relacionados con células B.

Descripción de la técnica relacionada

Diversas enfermedades significativas involucran linfocitos B, es decir, células B. Una fisiología anómala de las células B
15 también puede llevar al desarrollo de enfermedades autoinmunes que incluyen, de modo no taxativo, lupus eritematoso sistémico (SLE, por su sigla en inglés). La transformación maligna de células B conduce a cánceres que incluyen, de modo no taxativo, linfomas, p. ej., mieloma múltiple y linfoma no Hodgkin.

20

La gran mayoría de los pacientes con neoplasias de células B, incluidos linfoma no Hodgkin (NHL, por su sigla en inglés) y mieloma múltiple (MM), constituyen una gran parte de la mortalidad por cáncer. La respuesta de neoplasias de células B

a diversas formas de tratamiento es mixta. Los métodos tradicionales para tratar las neoplasias de células B, incluidas la quimioterapia y la radioterapia, tienen una utilidad limitada debido a los efectos secundarios tóxicos. La inmunoterapia con anticuerpos terapéuticos anti-CD19, anti-CD20, anti-CD22, anti-CD23, anti-CD52, anti-CD80 y anti-HLA-DR ha brindado un éxito limitado, debido en parte a malos perfiles farmacocinéticos, rápida eliminación de los anticuerpos con proteasas séricas y filtración en el glomérulo, así como penetración limitada en el lugar del tumor y niveles de expresión del antígeno objetivo en las células cancerosas. Los intentos de utilizar células genéticamente modificadas con expresión de receptores de antígenos quiméricos (CAR) también han tenido un éxito limitado. Asimismo, la eficacia terapéutica de un dominio de unión al antígeno específico que se utilice en un CAR es impredecible: si el dominio de unión al antígeno se une con demasiada fuerza, las células T del CAR inducen una liberación masiva de citocinas que produce una reacción inmunológica posiblemente fatal que se considera una «tormenta de citocinas» y, si el dominio de unión al antígeno se une con demasiada debilidad, las células T del CAR no presentan suficiente eficacia terapéutica en la eliminación de las células cancerosas.

BREVE COMPENDIO

La invención brinda, en términos generales, vectores mejorados para generar terapias de células T y métodos para utilizarlas.

5

En diversas modalidades, se brinda un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende: un dominio extracelular que comprende un antígeno anti-BCMA (antígeno de maduración de células B, por su sigla en inglés) de murino o fragmento de
 10 unión al antígeno de este que se une a uno o más epítomos de un polipéptido de BCMA humano, un dominio transmembrana, uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelular y un dominio de señalización primaria.

15 En modalidades particulares, el anticuerpo anti-BCMA de murino o fragmento de unión al antígeno que se une al polipéptido de BCMA humano se selecciona del grupo que consiste en: una IG de camello, NAR de Ig, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab)'2, fragmentos F(ab)'3, Fv,
 20 anticuerpo Fv de cadena simple («scFv»), bis-scFv, (scFv)2, minicuerpo, diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, proteína Fv estabilizada con disulfuro («dsFv») y anticuerpo de dominio simple (sdAb, nanocuerpo).

En modalidades adicionales, el anticuerpo anti-BCMA de murino o fragmento de unión al antígeno que se une al polipéptido de BCMA humano es un scFv.

- 5 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-BCMA de murino o fragmento de unión al antígeno de este comprende una o más CDR, como se indica en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-3.

En modalidades particulares, el anticuerpo anti-BCMA de
10 murino o fragmento de unión al antígeno de este comprende una o más CDR, como se indica en cualquiera de las SEQ ID NO: 4-6.

En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-BCMA de
15 murino o fragmento de unión al antígeno de este comprende una secuencia de cadena ligera variable como se indica en la SEQ ID NO: 7.

En modalidades particulares, la cadena ligera variable
20 comprende las secuencias de CDR indicadas en las SEQ ID NO: 1-3.

En otras modalidades, el anticuerpo anti-BCMA de murino o fragmento de unión al antígeno de este comprende una

secuencia de cadena pesada variable como se indica en la SEQ ID NO: 8.

En modalidades adicionales, la cadena pesada variable
5 comprende las secuencias de CDR indicadas en las SEQ ID NO:
4-6.

En otras modalidades, el dominio transmembrana proviene de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: cadena
10 alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154 y PD1.

En algunas modalidades, el dominio transmembrana proviene de
15 un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: CD8 α ; CD4, CD45, PD1 y CD154.

En determinadas modalidades, el dominio transmembrana
proviene de CD8 α .
20

En modalidades particulares, el o los dominios de señalización coestimuladora provienen de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83,

CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4),
CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1),
CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM y ZAP70.

5 En modalidades particulares, el o los dominios de
señalización coestimuladora provienen de una molécula
coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CD28,
CD134 y CD137.

10 En modalidades adicionales, el o los dominios de señalización
coestimuladora provienen de una molécula coestimuladora
seleccionada del grupo que consiste en: CD28, CD134 y CD137.

En modalidades adicionales, el o los dominios de señalización
15 coestimuladora provienen de CD28.

En modalidades particulares, el o los dominios de
señalización coestimuladora provienen de CD134.

20 En otras modalidades, el o los dominios de señalización
coestimuladora provienen de CD137.

En determinadas modalidades, un CAR comprende un polipéptido
de región bisagra.

En otras modalidades, el polipéptido de región bisagra comprende una región bisagra de CD8 α .

- 5 En algunas modalidades, un CAR comprende una región separadora.

En modalidades adicionales, el polipéptido de región separadora comprende regiones CH2 y CH3 de IgG1 o IgG4.

10

En modalidades particulares, un CAR comprende un péptido señal.

- En otras modalidades, el péptido señal comprende un polipéptido señal de cadena pesada de IgG1, péptido señal del receptor del factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos 2 (GM-CSFR2) o un polipéptido señal de CD8 α .
- 15

- 20 En una modalidad, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 9.

En diversas modalidades, se brinda un polinucleótido que codifica un CAR contemplado en la presente.

En diversas modalidades particulares, se brinda un polinucleótido que codifica un CAR, en el que la secuencia de polinucleótidos se indica en la SEQ ID NO: 10.

5

En diversas modalidades determinadas, se brinda un vector que comprende un polinucleótido que codifica un CAR contemplado en la presente o como se indica en la SEQ ID NO: 10.

10 En determinadas modalidades, el vector es un vector de expresión.

En modalidades adicionales, el vector es un vector episomal.

15 En modalidades particulares, el vector es un vector viral.

En otras modalidades, el vector es un vector retroviral.

En otras modalidades, el vector es un vector lentiviral.

20

En una modalidad, un vector que codifica un CAR de BCMA comprende la secuencia de polinucleótidos que se indica en la SEQ ID NO: 36.

En modalidades adicionales, el vector lentiviral se selecciona del grupo que consiste esencialmente en: virus de inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1), virus de inmunodeficiencia humana 2 (HIV-2), virus de visna-maedi
5 (VMV), virus de artritis-encefalitis caprina (CAEV), virus de anemia infecciosa equina (EIAV), virus de inmunodeficiencia felina (FIV), virus de inmunodeficiencia bovina (BIV) y virus de inmunodeficiencia simia (SIV).

10 En modalidades particulares, un vector comprende una LTR retroviral izquierda (5'), una señal de envoltura Psi (Ψ), una extensión central de polipurina/flap de ADN (cPPT/FLAP, por su sigla en inglés), un elemento de exportación retroviral, un promotor enlazado de forma operativa al
15 polinucleótido que codifica un CAR contemplado en la presente y una LTR retroviral derecha (3').

En otras modalidades, un CAR comprende una secuencia de poliadenilación heteróloga.

20

En algunas modalidades, un CAR comprende un elemento regulador postranscripción del virus de hepatitis B (HPRE, por su sigla en inglés) o elemento regulador postranscripción de la marmota (WPRE, por su sigla en inglés).

En determinadas modalidades, el promotor de la LTR 5' se reemplaza con un promotor heterólogo.

5 En otras modalidades, el promotor heterólogo es un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor del virus de sarcoma de Rous (RSV, por su sigla en inglés) o un promotor del virus de simio 40 (SV40, por su sigla en inglés).

10 En modalidades particulares, la LTR 5' o LTR 3' es una LTR de lentivirus.

En modalidades particulares, la LTR 3' comprende una o más modificaciones.

15

En algunas modalidades, la LTR 3' comprende una o más eliminaciones.

En determinadas modalidades, la LTR 3' es una LTR de
20 autoinactivación (SIN, por su sigla en inglés).

En algunas modalidades, la secuencia de poliadenilación es una secuencia de señal de poliadenilación de β -globina de conejo o de poliadenilación de la hormona de crecimiento

bovina.

En modalidades adicionales, un polinucleótido que codifica un CAR contemplado en la presente comprende una secuencia de Kozak optimizada.

En otras modalidades, el promotor enlazado de forma operativa al polinucleótido que codifica un CAR contemplado en la presente se selecciona del grupo que consiste en: un promotor temprano del gen intermedio de citomegalovirus (CMV), un promotor alfa del factor de elongación 1 (EF1- α), un promotor de fosfoglicerato cinasa 1 (PGK), un promotor de ubiquitina C (UBQ-C), un potenciador de citomegalovirus/promotor de beta actina de pollo (CAG), potenciador de poliovirus/promotor de timidina cinasa de herpes simple (MC1), un promotor de beta actina (β -ACT), un promotor del virus de simio 40 (SV40) y un potenciador del virus de sarcoma mieloproliferativo, promotor con lugar de unión al cebador dl587rev sustituido y región de control negativo eliminada (MND).

20

En diversas modalidades, se brinda una célula efectora inmune que comprende un vector contemplado en la presente. En diversas modalidades, la célula efectora inmune se transduce con un vector contemplado en la presente.

En modalidades adicionales, la célula efectora inmune se selecciona del grupo que consiste en: un linfocito T y una célula citolítica natural (NK).

5

En algunas modalidades, la célula efectora inmune se transduce con el vector de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 46 y se activa y estimula en presencia de un inhibidor de la vía de PI3K, con lo cual mantiene la proliferación de las células efectoras inmunes transducidas en comparación con la proliferación de células efectoras inmunes transducidas activadas y estimuladas sin el inhibidor de la vía de PI3K.

En modalidades particulares, la célula efectora inmune activada y estimulada en presencia del inhibidor de la vía de PI3K tiene mayor expresión de i) uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en: CD62L, CD127, CD197 y CD38 o ii) todos los marcadores CD62L, CD127, CD197 y CD38, en comparación con una célula efectora inmune activada y estimulada sin el inhibidor de la vía de PI3K.

En una modalidad, el inhibidor de PI3K es ZSTK474.

En diversas modalidades, se brinda una composición que

comprende una célula efectora inmune contemplada en la presente y un excipiente fisiológicamente aceptable.

En diversas modalidades, se brinda un método para generar una
5 célula efectora inmune que comprende un CAR contemplado en la presente, que comprende introducir en una célula efectora inmune un vector que comprenda un polinucleótido que codifique el CAR.

10 En modalidades adicionales, el método comprende además estimular la célula efectora inmune e inducir la proliferación celular mediante contacto de la célula con anticuerpos que se unan a CD3 y anticuerpos que se unan a CD28, con lo cual se genera una población de células
15 efectoras inmunes.

En modalidades particulares, la célula efectora inmune se estimula y se induce su proliferación antes de introducir el vector.

20

En determinadas modalidades, las células efectoras inmunes comprenden linfocitos T.

En modalidades particulares, las células efectoras inmunes

comprenden células NK.

En modalidades particulares, las células se activan y estimulan en presencia de un inhibidor de la vía de PI3K, con lo cual mantiene la proliferación de las células efectoras inmunes transducidas en comparación con la proliferación de células efectoras inmunes activadas y estimuladas sin el inhibidor de la vía de PI3K.

En algunas modalidades, las células efectoras inmunes activadas y estimuladas en presencia del inhibidor de la vía de PI3K tienen mayor expresión de i) uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en: CD62L, CD127, CD197 y CD38 o ii) todos los marcadores CD62L, CD127, CD197 y CD38, en comparación con células efectoras inmunes activadas y estimuladas sin el inhibidor de la vía de PI3K.

En una modalidad, el inhibidor de PI3K es ZSTK474.

En diversas modalidades, se brinda un método para tratar una afección relacionada con células B en un sujeto que lo necesite, que comprende administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprenda células T de CAR de BCMA contempladas en la presente y,

opcionalmente, un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otras modalidades, la afección relacionada con células B es mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, proliferaciones de
5 células B de potencial neoplásico incierto, granulomatosis linfomatoide, trastorno linfoproliferativo postrasplante, un trastorno inmunorregulador, artritis reumatoide, miastenia gravis, trombocitopenia púrpura idiopática, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Chagas, enfermedad de Grave,
10 granulomatosis de Wegener, poliarteritis nodosa, síndrome de Sjogren, pénfigo vulgar, escleroderma, esclerosis múltiple, síndrome antifosfolípido, vasculitis asociada con ANCA, enfermedad de Goodpasture, enfermedad de Kawasaki, anemia hemolítica autoinmune y glomerulonefritis de avance rápido,
15 enfermedad de cadena pesada, amiloidosis asociada con inmunocitos o primaria o gammapatía monoclonal de significancia indeterminada.

En otras modalidades, la afección relacionada con células B
20 es una neoplasia de células B.

En determinadas modalidades, la neoplasia de células B es mieloma múltiple (MM) o linfoma no Hodgkin (NHL).

En determinadas modalidades, el MM se selecciona del grupo que consiste en: mieloma múltiple manifiesto, mieloma múltiple quiescente, leucemia de células plasmáticas, mieloma no secretor, mieloma de IgD, mieloma osteoesclerótico, 5 plamacitoma solitario de los huesos y plasmacitoma extramedular.

En algunas modalidades, el NHL se selecciona del grupo que consiste en: linfoma de Burkitt, leucemia linfocítica 10 crónica/linfoma linfocítico pequeño (CLL/SLL), linfoma de células B grandes difusas, linfoma folicular, linfoma de células grandes inmunoblásticas, linfoma linfoblástico B precursor y linfoma de células del manto.

15 En modalidades particulares, la afección relacionada con células B es una neoplasia de células plasmáticas.

En otras modalidades, la afección relacionada con células B es una enfermedad autoinmune.

20

En modalidades adicionales, la enfermedad autoinmune es lupus eritematoso sistémico.

En determinadas modalidades, la afección relacionada con

células B es artritis reumatoide.

En modalidades particulares, la afección relacionada con
células B es púrpura trombocitopénica idiopática o miastenia
5 grave o anemia hemolítica autoinmune.

BREVE DESCRIPCIÓN DE DIVERSAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

La **figura 1** muestra un esquema de construcciones CAR del
antígeno de maduración de células B de murino (muBCMA, por su
10 sigla en inglés).

La **figura 2a** muestra la cantidad de IFNg que se libera de
células T de CAR anti-BCMA02, células T de CAR anti-BCMA10 y
células T de CAR19Δ luego de haber cultivado conjuntamente las
15 células durante 24 horas con células K562 con expresión de
BCMA.

La **figura 2b** muestra la cantidad de IFNg que se libera de
células T de CAR anti-BCMA02, células T de CAR anti-BCMA10 y
20 células T CAR19Δ luego de haber cultivado conjuntamente las
células durante 24 horas con células K562 sin expresión de BCMA
en comparación con células K562 con expresión de BCMA.

La **figura 3** muestra la cantidad de citocinas inflamatorias en

medio de crecimiento de células T de control sin transducción, células T de CAR anti-BCMA02, células T de CAR anti-BCMA10 y células T CAR19 Δ , estimuladas 10 días antes del ensayo.

5 La **figura 4** muestra la cantidad de citocinas inflamatorias producida mediante células T de CAR anti-BCMA02, células T de CAR anti-BCMA10 y células T de CAR19 Δ sin estimulación de antígeno.

10 La **figura 5** muestra la expresión de marcadores fenotípicos de activación al final de la elaboración de células T de CAR anti-BCMA. Se midió la expresión de HLA-DR y CD25 en células T de CAR anti-BCMA02, células T de CAR anti-BCMA10 y células T de CAR19 Δ .

15

La **figura 6** muestra los niveles de caspasa 3 activada, una etapa necesaria en la apoptosis e importante para AICD en células T de CAR anti-BCMA10 y células T de CAR anti-BCMA02 sin estimulación de antígeno.

20

La **figura 7** muestra la cantidad de liberación de citocina inflamatoria en células T de CAR anti-BCMA02 y anti-BCMA10 en medios con suero bovino fetal (FBS, por su sigla en inglés), suero AB humano (HABS, por su sigla en inglés) o 100 ng/ml de

BCMA soluble.

La **figura 8A** muestra el volumen tumoral en ratones NOD scid gamma (NSG) con tumores de mieloma múltiple humano subcutáneo experimental (RPMI-8226) de ~100 mm³. Los ratones se trataron con vehículo, 10⁷ células T de CAR anti-BCMA02, 10⁷ células T de CAR anti-BCMA10 o Bortezomib (velcade).

La **figura 8B** muestra el volumen tumoral en ratones NOD scid gamma (NSG) con tumores de mieloma múltiple humano subcutáneo experimental (RPMI-8226) de ~100 mm³. Los ratones se trataron con vehículo, 10⁷ células T de CAR anti-BCMA02, 10⁷ células T de CAR anti-BCMA10 o Bortezomib (velcade).

La **figura 9** muestra el nivel de expresión de BCMA en líneas celulares de linfoma y leucemia (círculos) y la actividad de las células T de CAR anti-BCMA con respecto a cada línea celular (liberación de IFN γ , recuadros). Las líneas celulares tumorales negativas para BCMA (BCMA-): leucemia mielógena (K562), leucemia linfoblástica aguda (NALM-6 y NALM-16), linfoma de células del manto (REC-1) o linfoma de Hodgkin (HDLM-2) mostraron escasa o nula liberación de IFN γ . Las líneas celulares tumorales positivas para BCMA (BCMA+): leucemia linfoblástica crónica de células B (MEC-1), linfoma

de células del manto (JeKo-1), linfoma de Hodgkin (RPMI-6666), linfoma de Burkitt (células de Daudi y células de Ramos) y mieloma múltiple (RPMI-8226) mostraron una liberación sustancial de IFN γ .

5

La **figura 10A** muestra la actividad *in vivo* del vehículo, las células T de CAR antiCD19 Δ , las células T de CAR anti-CD19 y las células T de CAR anti-BCMA con respecto a células de linfoma de Burkitt con expresión de BCMA (células de Daudi) en un modelo de ratón NSG, cuando las células T de CAR se administran a los ratones a los 8 días desde la inducción tumoral.

10

La **figura 10B** muestra la actividad *in vivo* del vehículo, las células T de CAR antiCD19 Δ , las células T de CAR anti-CD19 y las células T de CAR anti-BCMA con respecto a células de linfoma de Burkitt con expresión de BCMA (células de Daudi) en un modelo de ratón NSG, cuando las células T de CAR se administran a los ratones a los 18 días desde la inducción tumoral.

15

20

La **figura 11** muestra actividad potente *in vitro* de células T de CAR anti-BCMA lograda con una reducción del 50 por ciento en la expresión de CAR anti-BCMA. (a) Las poblaciones de

células T se transdujeron con entre 4×10^8 y 5×10^7 unidades de transducción de un lentivirus con codificación de una molécula de CAR anti-BCMA (MOI de 5 a 40). Las poblaciones de células T resultantes se normalizaron para incluir 26 ± 4 %
5 de células T positivas para CAR anti-BCMA. (B) La MFI de las células T de CAR anti-BCMA normalizadas osciló entre 885 y 1875, según el análisis de citometría de flujo. (C) Las células BCMA K562 y K-562 se cultivaron en conjunto con células T de CAR anti-BCMA normalizadas a una relación de
10 20:1 o 10:1 de efector (E, célula T) a objetivo (T, mezcla 1:1 de célula BCMA K562 y K562) mostraron actividad citolítica comparable.

La **figura 12** muestra la confiabilidad del proceso de
15 fabricación de células T de CAR anti-BCMA. (A) los productos de células T de CAR anti-BCMA fabricados a partir de PBMC de 11 donantes individuales mostró niveles comparables de expansión en comparación con un cultivo en correspondencia de células T de donantes sin transducción. (B) los productos de
20 células T de CAR anti-BCMA fabricados a partir de 11 donantes mostraron eficacia de transducción lentiviral comparable (VCN). (C) La frecuencia de las células T positivas para CAR anti-BCMA se midió con citometría de flujo y se descubrió que la expresión de BCMA era comparable en todos los donantes.

(D) Los productos de células T de CAR anti-BCMA elaborados a partir de 11 donantes mostraron niveles terapéuticamente relevantes de liberación de IFN γ al exponerse a células K562 con expresión de BCMA.

5

La **figura 13** muestra diagramas de Venn para expresión conjunta de CD127, CD197 y CD38 en células T anti-BCMA02 positivas para CD62L cultivadas en presencia de IL-2 o IL-2 y ZSTK474 durante diez días. Las células T de CAR anti-BCMA02
10 tratadas con ZSTK474 mostraron un aumento en el porcentaje de células con expresión conjunta de CD127, CD197 y CD38 en comparación con células T de CAR anti-BCMA cultivadas solo con IL-2.

15 La **figura 14** muestra un mayor porcentaje de CD8 con expresión de células T de CAR anti-BCMA02 en cultivos tratados con IL-2 y ZSTK474 (n=7), en comparación con cultivos tratados solo con IL-2. La expresión de CD8 se determinó utilizando un anticuerpo anti-CD8 etiquetado de forma fluorescente y
20 citometría de flujo.

La **figura 15** muestra la cantidad de IFN- γ liberado de células T de CAR anti-BCMA02 de 14 donantes luego del cultivo solo con IL-2 o con IL-2 y ZSTK474. Al final del período de

cultivo, se volvió a cultivar una cantidad equivalente de células T de CAR anti-BCMA02 durante 24 horas solamente en medio. La cantidad de IFN- γ liberado en 24 horas se cuantificó mediante ELISA. El cultivo en ZSTK474 no aumentó
5 de forma considerable la liberación tónica de citocinas de células T de CAR anti-BCMA02 en comparación con las células T de CAR anti-BCMA02 cultivadas solo con IL-2.

La **figura 16** muestra actividad antitumoral de células T de
10 CAR anti-BCMA02 tratadas con IL-2 o IL-2 y ZSTK474 o una célula T de CAR anti-BCMA02 de señalización deficiente trunca (tBCMA02) tratada con IL-2 y ZSTK474 en un modelo tumoral de Daudi agresivo. Se observó regresión completa del tumor en el 50 % de los ratones que recibieron las células T de CAR anti-
15 BCMA02 tratadas con IL-2 y ZSTK474.

La **figura 17** muestra la actividad antitumoral de células T de CAR anti-BCMA02 tratadas con IL-2 o IL-2 y ZSTK474 en un modelo tumoral de mieloma múltiple (RPMI-8226). Los animales
20 tratados con células T de CAR anti-BCMA02 cultivadas con IL-2 o IL-2 y ZSTK474 evitaron por completo el sobrecrecimiento tumoral.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS IDENTIFICADORES DE SECUENCIA

Las **SEQ ID NO: 1-3** indican las secuencias de aminoácidos de ejemplos de secuencias de CDR de cadena ligera para los CAR BCMA contemplados en la presente.

- 5 Las **SEQ ID NO: 4-6** indican las secuencias de aminoácidos de ejemplos de secuencias de CDR de cadena pesada para los CAR BCMA contemplados en la presente.

La **SEQ ID NO: 7** indica la secuencia de aminoácidos de un
10 ejemplo de secuencias de cadena ligera para los CAR BCMA contemplados en la presente.

La **SEQ ID NO: 8** indica la secuencia de aminoácidos de un
ejemplo de secuencias de cadena pesada para los CAR BCMA
15 contemplados en la presente.

La **SEQ ID NO: 9** indica la secuencia de aminoácidos de un ejemplo de CAR BCMA contemplado en la presente.

- 20 La **SEQ ID NO: 10** indica una secuencia de polinucleótidos que codifica un ejemplo de CAR BCMA contemplado en la presente.

La **SEQ ID NO: 11** indica la secuencia de aminoácidos del BCMA humano.

La **SEQ ID NO: 12-22** indican la secuencia de aminoácidos de diversos enlazadores.

- 5 **Las SEQ ID NO: 23-35** indican la secuencia de aminoácidos de lugares de escisión de proteasa y lugares de escisión de polipéptidos de autoescisión.

La **SEQ ID NO: 36** indica la secuencia de polinucleótidos de un
10 vector que codifica un CAR BCMA.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A. INFORMACIÓN GENERAL

- 15 La invención hace referencia, en términos generales, a composiciones y métodos mejorados para tratar afecciones relacionadas con células B. Tal como se utiliza en la presente, el término «afecciones relacionadas con células B» hace referencia a afecciones que implican actividad inadecuada de
20 células B y neoplasias de células B.

En modalidades particulares, la invención hace referencia a una terapia mejorada de células adoptivas de afecciones relacionadas con células B que utiliza células efectoras
25 inmunes genéticamente modificadas. Los enfoques genéticos

ofrecen un posible medio para potenciar el reconocimiento inmune y la eliminación de células cancerosas. Una estrategia prometedora es modificar genéticamente células efectoras inmunes para expresar receptores de antígeno quimérico (CAR) que redirijan la citotoxicidad hacia las células cancerosas. No obstante, las inmunoterapias de células adoptivas existentes para tratar trastornos de células B presentan un riesgo grave de comprometer la inmunidad humoral, debido a que las células se dirigen a antígenos expresados en la totalidad o la mayoría de las células B. Por consiguiente, estas terapias no resultan clínicamente deseables y, por ello, sigue existiendo una necesidad en la técnica de contar con terapias más eficaces para afecciones relacionadas con células B que no afecten la inmunidad humoral.

15

Las composiciones y los métodos mejorados de terapia con células adoptivas que se describen en la presente brindan células efectoras inmunes genéticamente modificadas que se pueden expandir con facilidad, presentan persistencia a largo plazo *in vivo* y reducen la alteración de la inmunidad humoral dirigiéndose al antígeno de maduración de células B con expresión de células B (BCMA, también conocido como CD269 o miembro 17 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, TNFRSF17, por su sigla en inglés).

20

El BCMA es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (remitirse, p. ej., a Thompson et ál., *J. Exp. Medicine*, 192(1): 129-135, 2000, y Mackay et ál., *Annu. Rev. Immunol*, 21: 231-264, 2003. El BCMA se une al factor de activación de células B (BAFF, por su sigla en inglés) y un ligando de inducción de la proliferación (APRIL, por su sigla en inglés) (remitirse, p. ej., a Mackay et ál., 2003 y Kalled et ál., *Immunological Reviews*, 204: 43-54, 2005). Entre las células no malignas, se ha indicado que el BCMA se expresa principalmente en las células plasmáticas y subconjuntos de células B maduras (remitirse, p. ej., a Laabi et ál., *EMBO J.*, 77(1): 3897-3904, 1992; Laabi et ál., *Nucleic Acids Res.*, 22(7): 1147-1154, 1994; Kalled et ál., 2005; O'Connor et ál., *J. Exp. Medicine*, 199(1): 91-97, 2004 y Ng et ál., *J. Immunol.*, 73(2): 807-817, 2004. Los ratones deficientes en BCMA son saludables y tienen cantidades normales de células B, pero la supervivencia de células plasmáticas de larga supervivencia se ve afectada (remitirse, p. ej., a O'Connor et ál., 2004; Xu et ál., *Mol. Cell. Biol*, 21(12): 4067-4074, 2001 y Schiemann et ál., *Science*, 293(5537): 2111-2114, 2001). El ARN de BCMA se ha detectado a nivel universal en células de mieloma múltiple y en otros linfomas y diversos investigadores han detectado la proteína de BCMA en la superficie de células plasmáticas de

pacientes con mieloma múltiple (remitirse, p. ej., a Novak et ál., *Blood*, 103(2): 689-694, 2004; Neri et ál., *Clinical Cancer Research*, 73(19): 5903-5909, 2007; Bellucci et ál., *Blood*, 105(10): 3945-3950, 2005 y Moreaux et ál., *Blood*, 703(8): 3148-
5 3157, 2004.

En diversas modalidades, los CAR con secuencias de anticuerpo anti-BCMA de murino son altamente eficaces en comparación con los CAR de BCMA que comprenden secuencias particulares de
10 anticuerpos humanos, experimentan una fuerte expansión *in vivo* y reconocen células B humanas con expresión de BCMA, muestran actividad citotóxica contra los BCMA con expresión de células B y no muestran signos de inducción de tormenta de citocinas, una afección posiblemente fatal en la que las citocinas liberadas
15 por las células T activadas crean una respuesta inflamatoria repentina en el sistema que desata una fiebre no infecciosa.

En una modalidad, se brinda un CAR que comprende un anticuerpo anti-BCMA de murino o fragmento de unión al antígeno, un
20 dominio transmembrana y uno o más dominios de señalización intracelular.

En una modalidad, se presenta una célula efectora inmune genéticamente modificada para expresar un CAR contemplado en la

presente. Las células T con expresión de un CAR se indican en la presente como células T de CAR o células T de CAR modificadas.

- 5 En diversas modalidades, las células efectoras inmunes modificadas genéticamente contempladas en la presente se administran a un paciente con una afección relacionada con células B, p. ej., una enfermedad autoinmune asociada con células B o una neoplasia de células B.

10

La práctica de la invención utilizará, salvo que se especifique lo contrario, métodos convencionales de la química, bioquímica, química orgánica, biología molecular, microbiología, técnicas de ADN recombinante, genética, inmunología y biología celular

15 que se encuentran dentro de la pericia en la técnica, muchos de los cuales se describen a continuación con fines ilustrativos. Estas técnicas se explican por completo en la bibliografía. Remitirse, p. ej., a Sambrook, et ál., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª edición, 2001), Sambrook, et ál.,

20 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, 1989); Maniatis et ál., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); Ausubel et ál., *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley e hijos, actualizado en julio de 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current*

Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates y Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, tomos I y II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, Nueva York, 1992); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); Harlow y Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) *Current Protocols in Immunology* Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach y W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology*, así como monografías en jornales como *Advances in Immunology*.

B. DEFINICIONES

Salvo que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado comúnmente entendido por los expertos en la técnica a la que pertenece la invención. Si bien en la práctica o en el análisis de la presente invención se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente, en la presente se describen modalidades de composiciones, métodos y materiales preferidos. A efectos de la presente invención, a continuación se definen los siguientes términos.

Los artículos «un», «una», «el» y «la» se usan en la presente para hacer referencia a uno o a más de uno (es decir, al menos a uno o a uno o más) de los objetos gramaticales del artículo.

- 5 A modo de ejemplo, «un elemento» significa un elemento o uno o más elementos.

Debe entenderse que el uso de la forma alternativa (p. ej., «o») significa una, ambas o cualquier combinación de estas
10 alternativas.

El término «y/o» debe comprenderse como una indicación de una o ambas de las alternativas.

- 15 Tal como se utiliza en la presente, el término «alrededor de» o «aproximadamente» hace referencia a una cantidad, un nivel, un valor, un número, una frecuencia, un porcentaje, una dimensión, un tamaño, un monto, un peso o una longitud que varía en tanto como 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 %
20 con respecto a una cantidad, un nivel, un valor, un número, una frecuencia, un porcentaje, una dimensión, un tamaño, un monto, un peso o una longitud de referencia. En una modalidad, el término «alrededor de» o «aproximadamente» hace referencia a un intervalo de cantidad, nivel, valor, número, frecuencia,

porcentaje, dimensión, tamaño, monto, peso o longitud $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 9\%$, $\pm 8\%$, $\pm 7\%$, $\pm 6\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$ $\pm 1\%$ con respecto a una cantidad, un nivel, un valor, un número, una frecuencia, un porcentaje, una dimensión, un tamaño, un
5 monto, un peso o una longitud de referencia.

En toda la memoria descriptiva y salvo que el contexto requiera lo contrario, se debe entender que los términos «comprende», «comprende/n» y «que comprende» implican la inclusión de una
10 etapa o elemento o grupo de etapas o elementos indicados, pero no la exclusión de ninguna otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos. «Consiste en» significa que incluye, de modo taxativo, lo que siga en la frase «consiste en». Por lo tanto, la frase «consiste en» indica que los elementos
15 mencionados son necesarios u obligatorios y que no pueden estar presentes otros elementos. «Consiste esencialmente en» significa que incluye cualquier elemento mencionado luego de la frase, con limitación a otros elementos que no interfieran con la actividad o acción especificada en la descripción para los
20 elementos mencionados ni contribuyan con estas. Por lo tanto, la frase «consiste esencialmente en» indica que los elementos mencionados son necesarios u obligatorios, pero no que no hay otros elementos presentes que afecten de forma material la actividad o acción de los elementos mencionados.

La referencia en toda la presente memoria descriptiva a «una modalidad», «una modalidad particular», «una modalidad relacionada», «una determinada modalidad», «una modalidad
5 adicional» u «otra modalidad» o combinaciones de estos significa que un elemento, una estructura o una característica particular descrita en conexión con la modalidad se incluye en al menos una modalidad de la presente invención. Por lo tanto, la aparición de las frases precedentes en diversos puntos en
10 toda la presente memoria descriptiva no necesariamente hace referencia a la misma modalidad. Además, los elementos, las estructuras o las características particulares se pueden combinar de cualquier forma adecuada en una o más modalidades. También se comprende que la mención positiva de un elemento en
15 una modalidad sirve como base para la exclusión del elemento en una modalidad particular.

C. RECEPTORES DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS

En diversas modalidades, se brindan receptores genéticamente
20 modificados que redirigen la citotoxicidad de las células efectoras inmunes hacia las células B. Estos receptores genéticamente modificados se indican en la presente como receptores de antígenos quiméricos (CAR). Los CAR son moléculas que combinan la especificidad basada en anticuerpo con respecto

a un antígeno deseado (p. ej., BCMA) con un dominio intracelular de activación del receptor de células T para generar una proteína quimérica que presente una actividad inmunológica celular anti-BCMA específica. Tal como se utiliza
5 en la presente, el término «quimérico/a» describe el hecho de estar compuesto/a por partes de diferentes proteínas o ADN de diferentes orígenes.

Los CAR contemplados en la presente comprenden un dominio
10 extracelular (también indicado como un dominio de unión o dominio de unión específico del antígeno) que se une a BCMA, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. El contacto del dominio de unión al antígeno anti-BCMA del CAR con el BCMA en la superficie de una célula
15 objetivo produce un agrupamiento del CAR y suministra un estímulo de activación a la célula con CAR. La principal característica de los CAR es su capacidad para redirigir la especificidad de la célula efectora inmune, con lo cual se desencadena la proliferación, la producción de citocinas, la
20 fagocitosis o la producción de moléculas que pueden mediar la muerte celular de la célula con expresión del antígeno objetivo de forma independiente de la histocompatibilidad principal (MHC, por su sigla en inglés), y así se explotan las capacidades de direccionamiento específico de la célula de

anticuerpos monoclonales, ligandos solubles o receptores conjuntos específicos de la célula.

En diversas modalidades, un CAR comprende un dominio de unión
5 extracelular que comprende un dominio de unión específico anti-BCMA de murino, un dominio transmembrana, uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelular y un dominio de señalización primaria.

10 En modalidades particulares, un CAR comprende un dominio de unión extracelular que comprende un anticuerpo anti-BCMA de murino o fragmento de unión al antígeno de este, uno o más dominios de bisagra o dominios separadores, un dominio transmembrana que incluye uno o más dominios de señalización
15 coestimuladora intracelulares y un dominio de señalización primaria.

1. DOMINIO DE UNIÓN

En modalidades particulares, los CAR contemplados en la
20 presente comprenden un dominio de unión extracelular que comprende un anticuerpo anti-BCMA de murino o fragmento de unión al antígeno de este que se une de forma específica a un polipéptido de BCMA humano expresado en una célula B. Tal como se utilizan en la presente, los términos «dominio de unión»,

«dominio extracelular», «dominio de unión extracelular»,
«dominio de unión específico del antígeno» y «dominio de unión
específico del antígeno extracelular» se utilizan de forma
intercambiable y brindan un CAR con la capacidad de unirse de
5 forma específica al antígeno objetivo de interés, p. ej., BCMA.
El dominio de unión puede derivarse de una fuente natural,
sintética, semisintética o recombinante.

Los términos «afinidad de unión específica» o «se une de forma
10 específica» o «unido/a de forma específica» o «que se une de
forma específica» o «se dirige de forma específica», tal como
se utilizan en la presente, describen la unión de un anticuerpo
anti-BCMA o fragmento de unión al antígeno de este (o un CAR
que los comprende) al BCMA con una afinidad de unión mayor al
15 dominio de referencia. Un dominio de unión (o un CAR que
comprende un dominio de unión o una proteína de fusión con un
dominio de unión) «se une de forma específica» a un BCMA si se
une o asocia con el BCMA con una afinidad o K_a (es decir, una
constante de asociación en equilibrio de una interacción de
20 unión particular con unidades de $1/M$), por ejemplo, mayor o
igual a alrededor de $10^5 M^{-1}$. En determinadas modalidades, un
dominio de unión (o una proteína de fusión de este) se une a un
objetivo con una K_a mayor o igual a alrededor de $10^6 M^{-1}$, $10^7 M^{-1}$,
 $10^8 M^{-1}$, $10^9 M^{-1}$, $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$, $10^{12} M^{-1}$ o $10^{13} M^{-1}$. Dominios

de unión de «gran afinidad» (o proteínas de fusión de cadena simple de estos) hace referencia a los dominios de unión con una K_a de al menos 10^7 M^{-1} , al menos 10^8 M^{-1} , al menos 10^9 M^{-1} , al menos 10^{10} M^{-1} , al menos 10^{11} M^{-1} , al menos 10^{12} M^{-1} , al menos 10^{13} M^{-1} o mayor.

De forma alternativa, la afinidad se puede definir como una constante de disociación en equilibrio (K_d) de una interacción de unión particular con unidades de M (p. ej., 10^{-5} M a 10^{-13} M o menos). Las afinidades de proteína CAR y polipéptidos de dominio de unión de acuerdo con la presente descripción se pueden determinar fácilmente utilizando técnicas convencionales, p. ej., mediante ELISA (ensayo de inmunoabsorción enlazado por enzima) de competencia o mediante asociación de unión o ensayos de desplazamiento con ligandos etiquetados o utilizando un dispositivo de resonancia de plasmones superficiales como el Biacore T100, que se puede obtener de Biacore, Inc., Piscataway, NJ, o tecnología de biosensor óptico como el sistema EPIC o EnSpire que se pueden obtener de Corning y Perkin Elmer, respectivamente (remitirse también, p. ej., a Scatchard et ál. (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660 y las patentes estadounidenses n.º 5,283,173; 5,468,614 o el equivalente).

- En una modalidad, la afinidad de unión específica es alrededor de 2 veces mayor a la unión de referencia, alrededor de 5 veces mayor a la unión de referencia, alrededor de 10 veces mayor a la unión de referencia, alrededor de 20 veces mayor a la unión de referencia, alrededor de 50 veces mayor a la unión de referencia, alrededor de 100 veces mayor a la unión de referencia o alrededor de 1000 veces mayor a la unión de referencia o más.
- 10 En modalidades particulares, el dominio de unión extracelular de un CAR comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este. Un «anticuerpo» hace referencia a un agente de unión que es un polipéptido que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena
- 15 pesada que reconoce y se une de forma específica a un epítipo de un antígeno, como un péptido, un lípido, un polisacárido o un ácido nucleico con un determinante antigénico, como los reconocidos por una célula inmune.
- 20 Un «antígeno (Ag)» hace referencia a un compuesto, una composición o una sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de células T en un animal, incluidas composiciones (como una que incluya una proteína específica del cáncer) que se inyectan o absorben en un animal.

Un antígeno reacciona con los productos de la inmunidad celular o humoral específica, incluidos los inducidos por antígenos heterólogos, como los antígenos descritos. En modalidades particulares, el antígeno objetivo es un epítopo de un
 5 polipéptido de BCMA.

Un «epítopo» o «determinante antigénico» hace referencia a la región de un antígeno a la cual se une un agente de unión. Los epítopos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos
 10 contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente se retienen al exponerse a solventes desnaturizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario típicamente
 15 se pierden al tratarse con solventes desnaturizantes. Un epítopo típicamente incluye al menos 3 y más normalmente al menos 5, alrededor de 9 o alrededor de 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

20 Los anticuerpos incluyen fragmentos de unión al antígeno de estos, como la Ig de camello, NAR Ig, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab)'₂, fragmentos F(ab)'₃, Fv, proteínas Fv de cadena simple («scFv»), bis-scFv (scFv)₂, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, proteínas

Fv estabilizadas con disulfuro («dsFv») y anticuerpo de dominio simple (sdAb, nanocuerpo) y partes de anticuerpos de longitud completa responsables de la unión de antígeno. El término también incluye formas genéticamente modificadas, como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados), anticuerpos heteroconjugados (como anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de unión al antígeno de estos. Remitirse también a Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3^a Ed., W. H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

Como comprenderá el experto en la técnica y como se describe en otros puntos en la presente, un anticuerpo completo comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena pesada consiste en una región variable y una primera, segunda y tercera región constante, mientras que cada cadena ligera consiste en una región variable y una región constante. Las cadenas pesadas de mamíferos se clasifican como α , δ , ϵ , γ y μ . Las cadenas ligeras de mamíferos se clasifican como λ o κ . Las inmunoglobulinas que comprenden las cadenas pesadas α , δ , ϵ , γ y μ se clasifican como inmunoglobulina (Ig)A, IgD, IgE, IgG e IgM. El anticuerpo completo forma una forma de «Y». El tallo de la Y consiste en la segunda y la tercera región constante (y, para IgE e IgM, la cuarta región constante) de dos cadenas pesadas

unidas entre sí y se forman uniones disulfuro (entre cadenas) en la bisagra. Las cadenas pesadas γ , α y δ tienen una región constante compuesta por tres dominios Ig dobles (en línea) y una región bisagra para mayor flexibilidad, las cadenas pesadas μ y ϵ tienen una región constante compuesta por cuatro dominios de inmunoglobulina. La segunda y tercera región constante se indican como «dominio CH2» y «dominio CH3», respectivamente. Cada brazo de la Y incluye la región variable y la primera región constante de una única cadena pesada unida a las regiones variable y constante de una única cadena ligera. Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada son responsables por la unión del antígeno.

Las regiones variables de cadena ligera y pesada contienen una región «marco» interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas «regiones determinantes de complementariedad» o «CDR» [por su sigla en inglés]. Las CDR se pueden definir o identificar con métodos convencionales, como mediante la secuencia según Kabat et ál (Wu, TT y Kabat, E. A., *J Exp Med.* 132(2):211-50, (1970); Borden, P. y Kabat E. A., *PNAS*, 84: 2440-2443 (1987); (remitirse a Kabat et ál., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Departamento de salud y servicios humanos de Estados Unidos 1991, que se incorpora a la presente mediante esta referencia) o mediante la

estructura según Chothia *et ál* (Choithia, C. y Lesk, A.M., *J Mol. Biol.*, 196(4): 901-917 (1987), Choithia, C. *et ál*, *Nature*, 342: 877 - 883 (1989)).

5 Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas se conservan de forma relativa dentro de una especie, como los seres humanos. La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas ligera y pesada que lo constituyen, sirven para
10 posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional. Las CDR son principalmente responsables de unirse a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se indican de forma típica como CDR1, CDR2 y CDR3 y se numeran en secuencia a partir del extremo N. Asimismo, también se identifican típicamente
15 mediante la cadena en la que se ubica la CDR particular. Por lo tanto, las CDR ubicadas en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo se indican como CDRH1, CDRH2 y CDRH3, mientras que las CDR ubicadas en el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo se indican como CDRL1, CDRL2 y
20 CDRL3. Los anticuerpos con diferentes especificidades (es decir, diferentes lugares de combinación para diferentes antígenos) tienen diferentes CDR. Si bien la CDR es la que varía entre anticuerpos, solamente una cantidad limitada de posiciones de aminoácidos en las CDR se encuentra directamente

implicada en la unión del antígeno. Estas posiciones en las CDR se denominan residuos determinantes de especificidad (SDR, por su sigla en inglés). Los ejemplos ilustrativos de CDR de cadena ligera adecuadas para construir CAR de BCMA humanizados que se contemplan en la presente incluyen, de modo no taxativo, las secuencias de CDR que se indican en las SEQ ID NO: 1-3. Los ejemplos ilustrativos de CDR de cadena pesada adecuadas para construir CAR de BCMA humanizados que se contemplan en la presente incluyen, de modo no taxativo, las secuencias de CDR que se indican en las SEQ ID NO: 4-6.

Las referencias a «VH» o «VH» hacen referencia a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluidas la de un anticuerpo, Fv, scFv, dsFv, Fab u otro fragmento de anticuerpo descrito en la presente. Las referencias a «VL» o «VL» hacen referencia a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, incluidas la de un anticuerpo, Fv, scFv, dsFv, Fab u otro fragmento de anticuerpo descrito en la presente.

20

Un «anticuerpo monoclonal» es un anticuerpo producido mediante un único clon de linfocitos B o mediante una célula en la cual se transfectaron los genes de cadena ligera y pesada de un único anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen a

través de métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante realización de células formadoras de anticuerpos híbridos a partir de una fusión de células de mieloma con células inmunes del bazo. Los anticuerpos
5 monoclonales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados.

Un «anticuerpo quimérico» tiene residuos marco de una especie, como un ser humano, y CDR (que generalmente confieren unión al antígeno) de otra especie, como un ratón. En modalidades
10 preferidas particulares, un CAR contemplado en la presente comprende un dominio de unión específico del antígeno que es un anticuerpo quimérico o fragmento de unión al antígeno de este.

Un anticuerpo «humanizado» es una inmunoglobulina que incluye
15 una región marco humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, un ratón, una rata o sintética). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina «donante» y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se denomina «aceptora».

20

En modalidades particulares, un anticuerpo anti-BCMA de murino o fragmento de unión al antígeno de este incluye, de modo no taxativo, una IG de camello (un anticuerpo de camélido (VHH)), NAR de Ig, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab)'2,

fragmentos F(ab)'₃, Fv, anticuerpo Fv de cadena simple («scFv»), bis-scFv, (scFv)₂, minicuerpo, diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, proteína Fv estabilizada con disulfuro («dsFv») y anticuerpo de dominio simple (sdAb, nanocuerpo).

5

«Ig de camello» o «VHH de camélido», tal como se utilizan en la presente, hacen referencia a la unidad de unión al antígeno más pequeña conocida de un anticuerpo de cadena pesada (Koch-Nolte, *et ál*, FASEB J., 21: 3490-3498 (2007)). Un «anticuerpo de

10 cadena pesada» o un «anticuerpo camélido» hace referencia a un anticuerpo que contiene dos dominios VH y ninguna cadena ligera (Riechmann L. *et ál*, J. Immunol. Methods 231:25-38 (1999); WO94/04678; WO94/25591; patente estadounidense n.º 6,005,079).

15 «IgNAR» de «receptor de antígeno de nueva inmunoglobulina» hace referencia a una clase de anticuerpos del repertorio inmunológico de tiburón que consiste en homodímeros de dominio de receptor de antígeno nuevo variable (VNAR, por su sigla en inglés) y cinco dominios de receptores de antígeno nuevo

20 constante (CNAR, por su sigla en inglés). Los IgNAR representan algunos de los andamiajes de proteína a base de inmunoglobulina más pequeños conocidos y son altamente estables y poseen características de unión eficaz. La estabilidad inherente se puede atribuir tanto a (i) el andamiaje de Ig subyacente, que

presenta una cantidad considerable de residuos expuestos a la superficie hidrofílica y cargados en comparación con los dominios VH y VL del anticuerpo convencional que se encuentran en anticuerpos murinos, como a (ii) características

5 estructurales de estabilización en los bucles de la región determinante de complementariedad (CDR) que incluyen puentes disulfuro entre bucles, así como patrones de enlaces hidrógeno dentro de los bucles.

10 La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, denominados fragmentos «Fab», cada uno con un único lugar de unión al antígeno, y un fragmento «Fc» residual cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizarse fácilmente. El tratamiento con

15 pepsina proporciona un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos lugares de combinación con antígenos y aun así es capaz de reticular el antígeno.

«Fv» es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un lugar

20 de unión al antígeno completo. En una modalidad, una especie Fv de cadena doble consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en una asociación no covalente estrecha. En una especie Fv de cadena simple (scFv), un dominio variable de cadena ligera y uno de cadena pesada

pueden enlazarse de forma covalante mediante un enlazador peptídico flexible, de modo que las cadenas ligera y pesada puedan asociarse en una estructura «dimérica» análoga a la de una especie Fv de cadena doble. Es en esta configuración que
5 las tres regiones hipervariables (HVR) de cada dominio variable interactúan para definir un lugar de unión al antígeno en la superficie de dímero VH-VL. De forma colectiva, las seis HVR le confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. No obstante, incluso un único dominio variable (o la mitad de un
10 Fv que comprenda solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad menor a todo el lugar de unión.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena
15 pesada y de cadena ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de algunos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio de cadena pesada CH1 que incluyen
20 una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. En la presente, Fab'-SH es la designación para un Fab' en el que el o los residuos de cisteína de los dominios constantes presentan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' con

cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

El término «diacuerpos» hace referencia a fragmentos de anticuerpos con dos lugares de unión al antígeno. Tales fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptidos (VH-VL). Al utilizar un enlazador demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos lugares de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen de forma más completa, por ejemplo, en EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson *et ál.*, Nat. Med. 9:129-134 (2003) y Hollinger *et ál.*, PNAS USA 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson *et ál.*, Nat. Med. 9:129-134 (2003).

«Anticuerpo de dominio simple» o «sdAb» o «nanocuerpo» hacen referencia a un fragmento de anticuerpo que consiste en la región variable de una cadena pesada de anticuerpo (dominio VH) o la región variable de una cadena ligera de anticuerpo (dominio VL) (Holt, L., *et ál.*, Trends in Biotechnology, 21(11):

484:-490).

Los fragmentos de anticuerpo de «Fv de cadena simple» o «scFv» comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que
5 estos dominios se encuentran presentes en una única cadena de polipéptidos y en cualquier orientación (p. ej., VL-VH o VH-VL). Generalmente, el polipéptido scFv comprende además un enlace polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno.
10 Para acceder a un análisis de scFv, remitirse, p. ej., a Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, tomo 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York, 1994), págs. 269-315.

15 En modalidades preferidas, un CAR contemplado en la presente comprende un dominio de unión específico del antígeno que es un scFv murino. Los anticuerpos de cadena simple se pueden clonar a partir de los genes de la región V de un hibridoma específico para un objetivo deseado. La producción de dichos hibridomas se
20 ha vuelto habitual. Una técnica que se puede utilizar para clonar la cadena pesada de la región variable (VH) y la cadena ligera de la región variable (VL) se describió, por ejemplo, en Orlandi *et ál.*, *PNAS*, 1989; 86: 3833-3837.

En modalidades particulares, el dominio de unión específica al antígeno que es un scFv murino que se une a un polipéptido de BCMA humano. Los ejemplos ilustrativos de cadenas pesadas variables adecuadas para construir CAR de BCMA que se
5 contemplan en la presente incluyen, de modo no taxativo, las secuencias de aminoácidos que se indican en la SEQ ID NO: 8. Los ejemplos ilustrativos de cadenas ligeras variables adecuadas para construir CAR de BCMA que se contemplan en la presente incluyen, de modo no taxativo, las secuencias de
10 aminoácidos que se indican en la SEQ ID NO: 7.

Los dominios de unión específicos de BCMA que se brindan en la presente también comprenden una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR. Estas CDR pueden ser CDR no humanas o CDR no humanas
15 alteradas seleccionadas de CDRL1, CDRL2 y CDRL3 de la cadena ligera y CDRH1, CDRH2 y CDRH3 de la cadena pesada. En determinadas modalidades, un dominio de unión específico de BCMA comprende (a) una región variable de cadena ligera que comprende una CDRL1 de cadena ligera, una CDRL2 de cadena
20 ligera y una CDRL3 de cadena ligera y (b) una región variable de cadena pesada que comprende una CDRH1 de cadena pesada, una CDRH2 de cadena pesada y una CDRH3 de cadena pesada.

2. ENLAZADORES

En determinadas modalidades, los CAR contemplados en la presente pueden comprender residuos enlazadores entre los diversos dominios, p. ej., agregados para una separación y conformación correctas de la molécula. En modalidades
5 particulares, el enlazador es una secuencia de enlace de región variable. Una «secuencia de enlace de región variable» es una secuencia de aminoácidos que conecta los dominios V_H y V_L y brinda una función de separación compatible con la interacción de los dos sub-dominios de unión para que el polipéptido
10 resultante retenga una afinidad de unión específica con respecto a la misma molécula objetivo que un anticuerpo que comprenda las mismas regiones variables de cadena ligera y pesada. Los CAR contemplados en la presente pueden comprender uno, dos, tres, cuatro o cinco o más enlazadores. En
15 modalidades particulares, la longitud de un enlazador es de alrededor de 1 a alrededor de 25 aminoácidos, alrededor de 5 a alrededor de 20 aminoácidos o alrededor de 10 a alrededor de 20 aminoácidos o cualquier longitud intermedia de aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 1, 2,
20 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más aminoácidos.

Los ejemplos ilustrativos de enlazadores incluyen polímeros de glicina $(G)_n$, polímeros de glicina-serina $(G_{1-5}S_{1-5})_n$, donde n es

un entero de al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros enlazadores flexibles conocidos en la técnica. Los polímeros de glicina y glicina-serina son relativamente desestructurados y, por lo tanto, pueden tener la capacidad de servir como conector neutro entre dominios de proteínas de fusión, como los CAR descritos en la presente. La glicina accede al espacio phi-psi de forma más significativa incluso que la alanina y está mucho menos restringida que los residuos con cadenas laterales más largas (remitirse a Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173-142 (1992)). El experto en la técnica reconocerá que el diseño de un CAR en modalidades particulares puede incluir enlazadores completa o parcialmente flexibles, de modo que el enlazador puede incluir un enlazador flexible así como una o más partes que confieran una estructura menos flexible para brindar una estructura de CAR deseada.

Otros ejemplos de enlazadores incluyen, de modo no taxativo, las siguientes secuencias de aminoácidos: GGG; DGGGS (SEQ ID NO: 12); TGEKP (SEQ ID NO: 13) (remitirse, p. ej., a Liu *et al.*, PNAS 5525-5530 (1997)); GGRR (SEQ ID NO: 14) (Pomerantz *et al.* 1995, *supra*); (GGGGS)_n en la que n = 1, 2, 3, 4 o 5 (SEQ ID NO: 15) (Kim *et al.*, PNAS 93, 1156-1160 (1996.)); EGKSSGSGSESKVD (SEQ ID NO: 16) (Chaudhary *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci.

EUA 87:1066-1070); KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 17) (Bird et al., 1988, Science 242:423-426), GGRRGGGS (SEQ ID NO: 18); LRQRDGERP (SEQ ID NO: 19); LRQKDGGGSERP (SEQ ID NO: 20); LRQKd(GGGS)₂ ERP (SEQ ID NO: 21). De forma alternativa, los
5 enlazadores flexibles pueden diseñarse de forma racional utilizando un programa informático con capacidad para realizar un modelo tanto de los lugares de unión al ADN como de los péptidos en sí mismos (Desjarlais & Berg, PNAS 90:2256-2260 (1993), PNAS 91:11099-11103 (1994) o con métodos de expresión
10 en fagos. En una modalidad, el enlazador comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 22) (Cooper et al., Blood, 101(4): 1637-1644 (2003)).

3. DOMINIO SEPARADOR

15 En modalidades particulares, el dominio de unión del CAR está seguido por uno o más «dominios separadores», que hacen referencia a la región que mueve al dominio de unión al antígeno en sentido opuesto a la superficie de la célula efectora para permitir un contacto correcto entre las células,
20 unión y activación del antígeno (Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412:-419). El dominio bisagra puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. En determinadas modalidades, un dominio separador es una parte de una inmunoglobulina que incluye, de modo no taxativo, una o más

regiones constantes de cadena pesada, p. ej., CH2 y CH3. El dominio separador puede incluir la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de inmunoglobulina de origen natural o una región bisagra de inmunoglobulina alterada.

5

En una modalidad, el dominio separador comprende los dominios CH2 y CH3 de IgG1 o IgG4.

4. DOMINIO BISAGRA

10 El dominio de unión del CAR está seguido generalmente por uno o más «dominios bisagra», que tienen incidencia en la colocación del dominio de unión al antígeno en sentido opuesto a la superficie de la célula efectora para permitir un contacto correcto entre las células, unión y activación del antígeno. Un

15 CAR generalmente comprende uno o más dominios bisagra entre el dominio de unión y el dominio transmembrana (TM, por su sigla en inglés). El dominio bisagra puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. El dominio bisagra puede incluir la secuencia de aminoácidos de una región

20 bisagra de inmunoglobulina de origen natural o una región bisagra de inmunoglobulina alterada.

Una «región bisagra alterada» hace referencia a (a) una región bisagra de origen natural con hasta 30 % de cambios de

aminoácidos (p. ej., hasta 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de sustituciones o eliminaciones de aminoácidos), (b) una parte de una región bisagra de origen natural de al menos 10 aminoácidos (p. ej., al menos 12, 13, 14 o 15 aminoácidos) de longitud con

5 hasta 30 % de cambios de aminoácidos (p. ej., hasta 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de sustituciones o eliminaciones de aminoácidos) o (c) una parte de una región bisagra de origen natural que comprende la región bisagra núcleo (que puede tener una longitud de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 o al

10 menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos). En determinadas modalidades, uno o más residuos de cisteína en una región bisagra de inmunoglobulina de origen natural puede sustituirse con uno o más residuos de aminoácido adicionales (p. ej., uno o más residuos de serina). Una región bisagra de

15 inmunoglobulina alterada puede tener de forma alternativa o adicional un residuo de prolina de una región de inmunoglobulina de tipo salvaje sustituida con otro residuo de aminoácido (p. ej., un residuo de serina).

20 Otros dominios bisagra ilustrativos adecuados para uso en los CAR descritos en la presente incluyen la región bisagra derivada de las regiones extracelulares de proteínas de membrana tipo 1 como CD8 α , CD4, CD28 y CD7, que pueden ser regiones bisagra de tipo salvaje de estas moléculas o pueden

estar alteradas. En otra modalidad, el dominio bisagra comprende una región bisagra CD8 α .

5. DOMINIO TRANSMEMBRANA (TM)

5 El «dominio transmembrana» es la parte del CAR que fusiona la parte de unión extracelular y el dominio de señalización intracelular y fija el CAR a la membrana plasmática de la célula efectora inmune. El dominio TM puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. El

10 dominio TM se puede derivar (es decir, comprende al menos la o las regiones transmembrana de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154 y PD1. En una modalidad particular, el

15 dominio TM es sintético y comprende predominantemente residuos hidrofóbicos como leucina y valina.

En una modalidad, los CAR contemplados en la presente comprenden un dominio TM derivado de CD8 α . En otra modalidad,

20 un CAR contemplado en la presente comprende un dominio TM derivado de CD8 α y un enlazador oligo o polipeptídico corto, preferentemente de entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de longitud que enlaza el dominio TM y el dominio de señalización intracelular del CAR. Un enlazador basado en

glicina-serina brinda un enlazador particularmente adecuado.

6. DOMINIO DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR

En modalidades particulares, los CAR contemplados en la
5 presente comprenden un dominio de señalización intracelular. Un
«dominio de señalización intracelular» hace referencia a la
parte de un CAR que participa en la transducción del mensaje de
unión eficaz del CAR de BCMA a un polipéptido de BCMA humano en
el interior de la célula efectora inmune para provocar una
10 función de la célula efectora, p. ej., activación, producción
de citocinas, proliferación y actividad citotóxica, incluida la
liberación de factores citotóxicos de la célula objetivo unida
al CAR u otras respuestas celulares provocadas por la unión del
antígeno al dominio CAR extracelular.

15

El término «función efectora» hace referencia a una función
especializada de una célula efectora inmune. La función
efectora de la célula T, por ejemplo, puede ser actividad
citolítica o auxiliar o actividad que incluye la secreción de
20 citocinas. Por lo tanto, el término «dominio de señalización
intracelular» hace referencia a la parte de una proteína que
transduce la señal de función efectora y dirige la célula para
que realice una función especializada. Si bien generalmente se
puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en

muchos casos no es necesario utilizar todo el dominio. En la medida en que se utilice una parte trunca de un dominio de señalización intracelular, dicha parte trunca se puede utilizar en lugar de todo el dominio, siempre que transduzca la señal de
5 función efectora. El término dominio de señalización intracelular pretende incluir cualquier parte trunca del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de función efectora.

10 Se sabe que las señales generadas a través del TCR solamente no son suficientes para una activación completa de la célula T y que también se requiere una señal secundaria o coestimuladora. Por lo tanto, se puede decir que la activación de células T está medida por dos clases distintas de dominios de
15 señalización intracelular: dominios de señalización primaria que inician la activación primaria dependiente del antígeno a través del TCR (p. ej., un complejo TCR/CD3) y dominios de señalización coestimuladora que actúan de forma independiente del antígeno para brindar una señal coestimuladora secundaria.
20 En modalidades preferidas, un CAR contemplado en la presente comprende un dominio de señalización intracelular que comprende uno o más «dominios de señalización coestimuladora» y un «dominio de señalización primaria».

Los dominios de señalización primaria regulan la activación primaria del complejo de TCR de forma estimuladora o de forma inhibidora. Los dominios de señalización primaria que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación en base a tirosina del inmunorreceptor o ITAM [por su sigla en inglés].

Los ejemplos ilustrativos de ITAM con dominios de señalización primaria de uso particular en la invención incluyen los derivados de TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En modalidades preferidas particulares, un CAR comprende un dominio de señalización primaria CD3 ζ y uno o más dominios de señalización coestimuladora. Los dominios de señalización coestimuladora y señalización primaria intracelular se pueden enlazar en cualquier orden en tándem con el extremo carboxilo del dominio transmembrana.

Los CAR contemplados en la presente comprenden uno o más dominios de señalización coestimuladora para potenciar la eficacia y la expansión de las células T que expresan receptores CAR. Tal como se utiliza en la presente, el término «dominio de señalización coestimuladora» o «dominio coestimulador» hace referencia a un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora. Las moléculas

coestimuladoras son moléculas de la superficie celular distintas a los receptores de antígenos o receptores Fc que brindan una segunda señal necesaria para una activación y función eficaces de los linfocitos T tras la unión al antígeno.

5 Los ejemplos ilustrativos de estas moléculas coestimuladoras incluyen CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM y ZAP70. En
10 una modalidad, un CAR comprende uno o más dominios de señalización coestimuladores seleccionados del grupo que consiste en CD28, CD137 y CD134 y un dominio de señalización primaria CD3ζ.

15 En otra modalidad, un CAR comprende dominios de señalización coestimuladora CD28 y CD137 y un dominio de señalización primaria CD3ζ.

En aun otra modalidad, un CAR comprende dominios de
20 señalización coestimuladora CD28 y CD134 y un dominio de señalización primaria CD3ζ.

En una modalidad, un CAR comprende dominios de señalización coestimuladora CD137 y CD134 y un dominio de señalización

primaria CD3ζ.

En modalidades particulares, los CAR contemplados en la presente comprenden un anticuerpo anti-BCMA de murino o
 5 fragmento de unión al antígeno de este que se une de forma específica a un polipéptido de BCMA expresado en células B.

En una modalidad, un CAR comprende un scFv anti-BCMA de murino que se une a un polipéptido de BCMA, un dominio transmembrana
 10 derivado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154 y PD1 y uno o más dominios de señalización coestimuladora
 15 intracelulares de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM
 20 y ZAP70 y un dominio de señalización primaria de TCRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ, CD22, CD79a, CD79b y CD66d.

En una modalidad, un CAR comprende un scFv anti-BCMA de murino que se une a un polipéptido de BCMA, un dominio bisagra

seleccionado del grupo que consiste en: bisagra de IgG1/CH2/CH3, bisagra de IgG4/CH2/CH3 y una bisagra CD8 α , un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154 y PD1 y uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelulares de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM y ZAP70 y un dominio de señalización primaria de TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b y CD66d.

En una modalidad, un CAR comprende un scFv anti-BCMA de murino que se une a un polipéptido de BCMA, un dominio bisagra seleccionado del grupo que consiste en: bisagra de IgG1/CH2/CH3, bisagra de IgG4/CH2/CH3 y una bisagra CD8 α , un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134,

CD137, CD152, CD 154 y PD1, un enlazador oligo o polipeptídico corto, de preferentemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de longitud que enlace el dominio TM con el dominio de señalización intracelular del CAR y uno o más dominios de
 5 señalización coestimuladora intracelulares de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278
 10 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM y ZAP70 y un dominio de señalización primaria de TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b y CD66d.

En una modalidad particular, un CAR comprende un scFc anti-BCMA
 15 de murino que se une a un polipéptido de BCMA, un dominio bisagra que comprende una bisagra de IgG1/polipéptido CH2/CH3 y un polipéptido CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α que comprende un enlazador polipeptídico de alrededor de 3 a alrededor de 10 aminoácidos, un domino de señalización
 20 coestimuladora intracelular CD137 y un dominio de señalización primaria CD3 ζ .

En una modalidad particular, un CAR comprende un scFc anti-BCMA de murino que se une a un polipéptido de BCMA, un dominio

bisagra que comprende un polipéptido CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α que comprende un enlazador polipeptídico de alrededor de 3 a alrededor de 10 aminoácidos, un dominio de señalización coestimuladora intracelular CD134 y un dominio de
5 señalización primaria CD3 ζ .

En una modalidad particular, un CAR comprende un scFc anti-BCMA de murino que se une a un polipéptido de BCMA, un dominio bisagra que comprende un polipéptido CD8 α , un dominio
10 transmembrana CD8 α que comprende un enlazador polipeptídico de alrededor de 3 a alrededor de 10 aminoácidos, un dominio de señalización coestimuladora intracelular CD28 y un dominio de señalización primaria CD3 ζ .

15 Asimismo, el diseño de los CAR contemplados en la presente permite una mejor expansión, persistencia a largo plazo y propiedades citotóxicas tolerables en las células T que expresan los CAR en comparación con las células T no modificadas o las células T modificadas para expresar otros
20 CAR.

D. POLIPÉPTIDOS

La presente invención contempla, en parte, polipéptidos de CAR y fragmentos de estos, células y composiciones que los

comprenden y vectores que expresan polipéptidos. En modalidades preferidas, se brinda un polipéptido que comprende uno o más CAR como se indica en la SEQ ID NO: 9.

5 «Polipéptido», «fragmento de polipéptido», «péptido» y «proteína» se utilizan de forma intercambiable, salvo que se especifique lo contrario y según su significado convencional, es decir, como una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos no se limitan a una longitud específica, p. ej., pueden
10 comprender una secuencia de proteínas de longitud completa o un fragmento de una proteína de longitud completa y pueden incluir modificaciones postraducción del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de
15 origen natural como no natural. En diversas modalidades, los polipéptidos CAR contemplados en la presente comprenden una secuencia señal (o líder) en el extremo N terminal de la proteína, que dirige de forma conjunta o posterior a la traducción la transferencia de la proteína. Los ejemplos
20 ilustrativos de secuencias de señal adecuadas útiles en los CAR descritos en la presente incluyen, de modo no taxativo, la secuencia señal de cadena pesada de IgG1 y la secuencia señal CD8 α . Los polipéptidos se pueden preparar utilizando cualquiera de diversas técnicas recombinantes y/o sintéticas conocidas.

Los polipéptidos contemplados en la presente comprenden de forma específica los CAR de la presente descripción o secuencias con eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de un CAR como se describe en la
5 presente.

Un «péptido aislado» o un «polipéptido aislado» y similares, tal como se utilizan en la presente, hacen referencia a aislamiento y/o purificación *in vitro* de una molécula de
10 péptido o polipéptido de un entorno celular y de asociación con otros componentes de la célula, es decir, no asociada de forma significativa con sustancias *in vivo*. De forma similar, una «célula aislada» hace referencia a una célula que se obtuvo de un tejido u órgano *in vivo* y se encuentra sustancialmente libre
15 de matriz extracelular.

Los polipéptidos incluyen «variantes de polipéptidos». Las variantes de polipéptidos pueden diferir de un polipéptido de origen natural en una o más sustituciones, eliminaciones,
20 adiciones y/o inserciones. Estas variantes pueden ser de origen natural o pueden generarse de forma sintética, por ejemplo, modificando una o más de las secuencias polipeptídicas anteriores. Por ejemplo, en modalidades particulares, puede resultar deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras

propiedades biológicas de los CAR introduciendo una o más sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones en un dominio de unión, bisagra, dominio TM, dominio de señalización coestimuladora o dominio de señalización primaria de un polipéptido de CAR. Preferentemente, los polipéptidos de la invención incluyen polipéptidos con al menos alrededor de 65 %, 70 %, 75 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad de aminoácidos con estos.

Los polipéptidos incluyen «fragmentos de polipéptidos». Los fragmentos de polipéptidos hacen referencia a un polipéptido, que puede ser monomérico o multimérico, con una eliminación amino-terminal, una eliminación carboxilo-terminal y/o una eliminación o sustitución interna de un polipéptido de origen natural o producido de forma recombinante. En determinadas modalidades, un fragmento de polipéptido puede comprender una cadena de aminoácidos de al menos 5 a alrededor de 500 aminoácidos de longitud. Se observará que, en determinadas modalidades, los fragmentos tienen una longitud de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 450 aminoácidos. Los fragmentos de polipéptido particularmente

útiles incluyen dominios funcionales, incluidos dominios de unión de anticuerpo o fragmentos de anticuerpos. En el caso de un anticuerpo anti-BCMA de murino, los fragmentos útiles incluyen, de modo no taxativo: una región CDR, una región CDR3
5 de la cadena pesada o ligera, una región variable de una cadena pesada o ligera, una parte de una cadena de anticuerpos o región variable, incluidas dos CDR y similares.

El polipéptido también se puede fusionar en marco o conjugarse
10 con un enlazador u otra secuencia para una mayor facilidad de síntesis, purificación o identificación del polipéptido (p. ej., poli-His) o para potenciar la unión del polipéptido a un soporte sólido.

15 Tal como se indicó anteriormente, los polipéptidos de la invención se pueden alterar de diversas formas, incluidas sustituciones, eliminaciones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. En la técnica se conocen en términos generales métodos para dichas manipulaciones. Por ejemplo, se pueden
20 preparar variantes de secuencias de aminoácidos de un polipéptido de referencia mediante mutaciones en el ADN. En la técnica se conocen métodos para alteraciones de secuencias de nucleótidos y mutagénesis. Remitirse, por ejemplo, a Kunkel (1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*. 82: 488-492), Kunkel et ál.,

(1987, *Methods in Enzymol*, 154: 367-382), patente estadounidense n.º 4,873,192, Watson, J. D. et ál., (*Molecular Biology of the Gene*, cuarta edición, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) y las referencias que allí se citan. Se
5 pueden encontrar lineamientos en cuanto a las sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan la actividad biológica de la proteína de interés en el modelo de Dayhoff et ál., (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.).

10

En determinadas modalidades, una variante contendrá sustituciones conservadoras. Una «sustitución conservadora» es una en la que un aminoácido sustituye otro aminoácido con propiedades similares, de modo que el experto en la técnica de
15 la química peptídica esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido se encontraran sustancialmente inalteradas. Se pueden realizar modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención y aun así obtener una molécula funcional que
20 codifique un polipéptido variante o derivado con características deseables. Cuando se desee alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido para crear un polipéptido variante equivalente o incluso mejorado de la invención, el experto en la técnica, por ejemplo, puede cambiar uno o más de

los codones de la secuencia de ADN de codificación, p. ej., de acuerdo con la tabla 1.

TABLA 1 -Codones de aminoácido

5

10

15

20

Aminoácidos	Código de una letra	Código de tres letras	Codones					
Alanina	A	Ala	GCA	GCC	GCG	GCU		
Cisteína	C	Cys	UGC	UGU				
Ácido aspártico	D	Asp	GAC	GAU				
Ácido glutámico	E	Glu	GAA	GAG				
Fenilalanina	F	Phe	UUC	UUU				
Glicina	G	Gly	GGA	GGC	GGG	GGU		
Histidina	H	His	CAC	CAU				
Isoleucina	I	Iso	AUA	AUC	AUU			
Lisina	K	Lys	AAA	AAG				
Leucina	L	Leu	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Metionina	M	Met	AUG					

5

10

Asparagina	N	Asn	AAC	AAU				
Prolina	P	Pro	CCA	CCC	CCG	CCU		
Glutamina	Q	Gln	CAA	CAG				
Arginina	R	Arg	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Serina	S	Ser	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Treonina	T	Thr	ACA	ACC	ACG	ACU		
Valina	V	Val	GUA	GUC	GUG	GUU		
Triptófano	W	Trp	UGG					
Tiosina	Y	Tyr	UAC	UAU				

Los lineamientos para determinar qué residuos de aminoácidos pueden sustituirse, insertarse o eliminarse sin eliminar la actividad biológica o inmunológica pueden encontrarse utilizado programas informáticos conocidos en la técnica, como el software DNASTAR™. Preferentemente, los cambios de aminoácidos en las variantes de proteínas que se describen en la presente son cambios de aminoácidos conservadores, es decir, sustituciones de aminoácidos con carga o sin carga similar. Un cambio de aminoácido conservador implica sustitución de uno de una familia de aminoácidos relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos de origen natural se dividen generalmente en cuatro familias: aminoácidos ácidos (aspartato,

glutamato), básicos (lisina, arginina, histidina), no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) y sin carga polar (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). Fenilalanina, triptófano y tirosina se clasifican algunas veces de forma conjunta como aminoácidos aromáticos. En un péptido o una proteína, los expertos en la técnica conocen las sustituciones conservadoras de aminoácidos adecuadas y estas generalmente se pueden realizar sin alterar una actividad biológica de una molécula resultante. Los expertos en la técnica reconocen que, en general, las sustituciones de un único aminoácido en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran la actividad biológica de forma sustancial (remitirse, p. ej., a Watson et ál. *Molecular Biology of the Gene*, 4ª edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p.224). Los ejemplos de sustituciones conservadoras se describen en la solicitud de patente estadounidense n.º 61/241,647, cuya descripción se incorpora a la presente mediante esta referencia.

En la realización de estos cambios, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. En la técnica se comprende la importancia del índice hidropático de los aminoácidos en la adjudicación de la función biológica interactiva a una proteína (Kyte y Doolittle, 1982, incorporado

a la presente mediante esta referencia). A cada aminoácido se le asignó un índice hidropático según sus características de carga e hidrofobicidad (Kyte y Doolittle, 1982). Estos valores son: isoleucina (+4.5), valina (+4.2), leucina (+3.8),
5 fenilalanina (+2.8), cisteína/cisteína (+2.5), metionina (+1.9), alanina (+1.8), glicina (-0.4), treonina (-0.7), serina (-0.8), triptófano (-0.9), tirosina (-1.3), prolina (-1.6), histidina (-3.2), glutamato (-3.5), glutamina (-3.5), aspartato (-3.5), asparagina (-3.5), lisina (-3.9) y arginina (-4.5).

10

En la técnica se sabe que determinados aminoácidos se pueden sustituir con otros aminoácidos con un valor o índice hidropático similar y aun así producir una proteína con actividad biológica similar, es decir, aun así obtener una
15 proteína biológica equivalente a nivel funcional. En la realización de dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos se encuentren dentro de ± 2 , se prefieren particularmente aquellos dentro de ± 1 y se prefieren incluso más particularmente aquellos dentro de ± 0.5 .
20 También se comprende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse de forma eficaz según la hidrofiliidad.

Tal como se detalla en la patente estadounidense n.º 4,554,101,

se han asignado los siguientes valores de hidrofiliicidad a los
residuos de aminoácidos: arginina (+3.0), lisina (+3.0),
aspartato (+3.0 $\pm$ 1), glutamato (+3.0 $\pm$ 1), serina (+0.3),
asparagina (+0.2), glutamina (+0.2), glicina (0), treonina (-
5 0.4), prolina (-0.5 $\pm$ 1), alanina (-0.5), histidina (-0.5),
cisteína (-1.0), metionina (-1.3), valina (-1.5), leucina (-
1.8), isoleucina (-1.8), tirosina (-2.3), fenilalanina (-2.5),
triptófano (-3.4). Se comprende que un aminoácido puede
sustituir otro con un valor de hidrofiliicidad similar y aun así
10 obtener una proteína biológicamente equivalente y, en
particular, una inmunológicamente equivalente. En dichos
cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos
valores de hidrofiliicidad se encuentren dentro de ± 2 , se
prefieren particularmente aquellos dentro de ± 1 y se prefieren
15 incluso más particularmente aquellos dentro de ± 0.5 .

Tal como se indicó anteriormente, las sustituciones de
aminoácidos se pueden basar en la similitud relativa de los
sustituyentes de cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su
20 hidrofobicidad, hidrofiliicidad, carga, tamaño y similares.

Las variantes de polipéptidos también incluyen formas
glicosiladas, conjugados acumulativos con otras moléculas y
conjugados covalentes con restos químicos no relacionados (p.

ej., moléculas pegiladas). Las variantes covalentes se pueden preparar enlazando funcionalidades con grupos que se encuentran en la cadena de aminoácidos o en el residuo de extremo N o C, como se conoce en la técnica. Las variantes también incluyen
5 variantes alélicas, variantes de especie y muteínas. Los truncamientos o las eliminaciones de regiones que no afectan la actividad funcional de las proteínas también son variantes.

En una modalidad, cuando se desea la expresión de dos o más
10 polipéptidos, las secuencias de polinucleótidos que los codifican se pueden separar mediante y secuencia IRES, como se describe en otro punto en la presente. En otra modalidad, se pueden expresar dos o más polipéptidos como una proteína de fusión que comprende una o más secuencias de polipéptidos de
15 autoescisión.

Los polipéptidos de la presente invención incluyen polipéptidos de fusión. En modalidades preferidas, se brindan polipéptidos de fusión y polinucleótidos que codifican polipéptidos de
20 fusión, p. ej., CAR. Los polipéptidos de fusión y las proteínas de fusión hacen referencia a un polipéptido con al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez o más segmentos de polipéptidos. Los polipéptidos de fusión son típicamente de extremo C ligados a extremo N, si bien también

pueden ser de extremo C ligado a extremo C, extremo N a extremo N o extremo N a extremo C. Los polipéptidos de la proteína de fusión pueden encontrarse en cualquier orden o en un orden específico. Los polipéptidos de fusión o las proteínas de fusión también pueden incluir variantes modificadas de forma conservadora, variantes polimórficas, alelos, mutantes, subsecuencias y homólogos entre especies, siempre que se conserve la actividad de transcripción deseada del polipéptido de fusión. Los polipéptidos de fusión se pueden producir con métodos sintéticos químicos o mediante enlace químico entre los dos restos o pueden prepararse generalmente utilizando otras técnicas estándar. Las secuencias de ADN ligadas que comprenden el polipéptido de fusión se enlazan de forma operativa a elementos de control de traducción o transcripción adecuados como se indica en otro punto en la presente.

En una modalidad, un compañero de fusión comprende una secuencia que ayuda en la expresión de la proteína (un potenciador de expresión) con mayores rendimientos que la proteína recombinante natural. Se pueden seleccionar otros compañeros de fusión para aumentar la solubilidad de la proteína o para permitir el direccionamiento de la proteína hacia compartimientos intracelulares deseados o para facilitar el transporte de la proteína de fusión a través de la membrana

celular.

Los polipéptidos de fusión también pueden comprender una señal de escisión de polipéptidos entre cada uno de los dominios de polipéptidos descritos en la presente. Asimismo, el lugar del polipéptido se puede colocar en cualquier secuencia peptídica del enlazador. Los ejemplos de señales de escisión de polipéptidos incluyen lugares de reconocimiento de escisión de polipéptidos como lugares de escisión de proteasa, lugares de escisión de nucleasa (p. ej., lugares de reconocimiento de enzimas de restricción raras, lugares de reconocimiento de ribozima de autoescisión) y oligopéptidos virales de autoescisión (remitirse a deFelipe y Ryan, 2004. *Traffic*, 5(8); 616-26).

15

El experto en la técnica conoce lugares de escisión de proteasa y péptidos de autoescisión adecuados (remitirse, p. ej., a Ryan et ál., 1997. *J. Gener. Virol.* 78, 699-722; Scymczak et ál. (2004) *Nature Biotech.* 5, 589-594). Los ejemplos de lugares de escisión de proteasa incluyen, de modo no taxativo, lugares de escisión de proteasas NIa de potivirus (p. ej., proteasa del virus del grabado del tabaco), proteasas HC de potivirus, proteasas P1 de potivirus (P35), proteasas NIa de biovirus, proteasas codificadas por ARN-2 biovirus, proteasas de

20

aftovirus L, proteasas de enterovirus 2A, proteasas de rinovirus 2A, proteasas de picorna 3C, proteasas de comovirus 24K, proteasas de nepovirus 24K, proteasa tipo 3C de RTSV (virus esférico del tungro del arroz), proteasa tipo 3C de PYVF (virus del moteado amarillo del rábano), heparina, trombina, factor Xa y enterocinasa. Debido a su gran rigor de escisión, en una modalidad se prefieren lugares de escisión de proteasa de TEV (virus del grabado del tabaco), p. ej., EXXYXQ(G/S) (SEQ ID NO: 23), por ejemplo, ENLYFQG (SEQ ID NO: 24) y ENLYFQS (SEQ ID NO: 25), en la que X representa cualquier aminoácido (la escisión mediante TEV se produce entre Q y G o Q y S).

En una modalidad particular, los péptidos de autoescisión incluyen las secuencias de polipéptidos obtenidas de péptidos de cardiovirus 2A y potivirus, FMDV (virus de fiebre aftosa), virus de rinitis equina A, virus de Thosa asigna y tesovirus porcino.

En determinadas modalidades, el lugar de polipéptidos de autoescisión comprende un lugar, una secuencia o un dominio de 2A o tipo 2A (Donnelly et ál., 2001. *J. Gen. Virol.* 82:1027-1041).

TABLA 2: Los ejemplos de lugares 2A incluyen las siguientes

secuencias:

5	SEQ ID NO: 26	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
	SEQ ID NO: 27	TLNFDLLKLAGDVESNPGP
	SEQ ID NO: 28	LLKLAGDVESNPGP
	SEQ ID NO: 29	NFDLLKLAGDVESNPGP
	SEQ ID NO: 30	QLLNFDLLKLAGDVESNPGP
	SEQ ID NO: 31	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
10	SEQ ID NO: 32	VTELLYRMKRAETCYCPRLAIHPTEARHKQKIVAPVKQT
	SEQ ID NO: 33	LNFDLLKLAGDVESNPGP
	SEQ ID NO: 34	LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
	SEQ ID NO: 35	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

15 En modalidades preferidas, un polipéptido contemplado en la presente comprende un polipéptido de CAR.

E. POLINUCLEÓTIDOS

20 En modalidades preferidas, se brinda un polinucleótido que codifica uno o más polipéptidos, p. ej., la SEQ ID NO: 10. Tal como se utilizan en la presente, los términos «polinucleótido» o «ácido nucleico» hacen referencia a ARN mensajero (ARNm), ARN, ARN genómico (ARNg), ARN de cadena positiva (ARN(+)), ARN de cadena negativa (ARN(-)), ADN genómico (ADNg), ADN

complementario (ADNc) o ADN recombinante. Los polinucleótidos incluyen polinucleótidos de cadena simple o doble. Preferentemente, los polinucleótidos de la invención incluyen polinucleótidos o variantes con al menos alrededor de 50 %, 55
5 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de referencia descritas en la presente (remitirse, p. ej., al listado de secuencias), típicamente donde la variante mantiene al menos una actividad biológica de
10 la secuencia de referencia. En diversas modalidades ilustrativas, la presente invención contempla, en parte, polinucleótidos que comprenden vectores de expresión, vectores virales y plásmidos de transferencia y composiciones y células que los comprenden.

15

En modalidades particulares, la presente invención brinda polinucleótidos que codifican al menos alrededor de 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 1000, 1250, 1500, 1750 o 2000 o más residuos de aminoácidos contiguos de un
20 polipéptido de la invención, así como todas las longitudes intermedias. Se comprenderá fácilmente que «longitudes intermedias» en este contexto significa cualquier longitud entre los valores indicados, como 6, 7, 8, 9, etc., 101, 102, 103, etc.; 151, 152, 153, etc.; 201, 202, 203, etc.

Tal como se utilizan en la presente, los términos «variante de polinucleótido» y «variante» y los similares hacen referencia a polinucleótidos que presentan una identidad de secuencia

5 sustancial con respecto a una secuencia de polinucleótido de referencia o polinucleótidos que se hibridan con una secuencia de referencia en condiciones rigurosas que se definen a continuación. Estos términos incluyen polinucleótidos en los que se agregaron o eliminaron uno o más nucleótidos o se

10 remplazaron con diferentes nucleótidos en comparación con un polinucleótido de referencia. En este sentido, se comprende en la técnica que se pueden realizar determinadas alteraciones que incluyen mutaciones, adiciones, eliminaciones y sustituciones en un polinucleótido de referencia, con las cuales el

15 polinucleótido alterado retiene la función o actividad biológica del polinucleótido de referencia.

Las menciones de «identidad de secuencia» o, por ejemplo, que comprenden «secuencia 50 % idéntica a», tal como se utilizan en

20 la presente, hacen referencia a la medida en la que las secuencias son idénticas nucleótido por nucleótido o aminoácido por aminoácido en un espectro de comparación. Por lo tanto, un «porcentaje de identidad de secuencia» se puede calcular comparando dos secuencias alineadas de manera óptima en el

espectro de comparación, determinando la cantidad de posiciones en las cuales se produce la base de ácidos nucleicos idénticos (p. ej., A, T, C, G, I) o el residuo de aminoácidos idéntico (p. ej., Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) en ambas secuencias para proporcionar la cantidad de posiciones emparejadas, dividiendo la cantidad de posiciones emparejadas entre la cantidad total de posiciones en el espectro de comparación (es decir, el tamaño del espectro) y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. Se incluyen nucleótidos y polipéptidos con al menos alrededor de 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de referencia descritas en la presente, típicamente donde la variante de polipéptido mantiene al menos una actividad biológica de la secuencia de referencia.

Los términos que se utilizan para describir relaciones de secuencias entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen «secuencia de referencia», «espectro de comparación», «identidad de secuencia», «porcentaje de identidad de secuencia» e «identidad sustancial». Una «secuencia de referencia» tiene al menos 12, pero frecuentemente 15 a 18 y a

menudo al menos 25 unidades monoméricas e incluye nucleótidos y residuos de aminoácidos en su longitud. Debido a que dos polinucleótidos pueden comprender cada (1) una secuencia (es decir, solamente una parte de la secuencia de polinucleótidos completa) similar entre los dos nucleótidos y (2) una secuencia divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencia entre dos (o más) polinucleótidos se realizan típicamente comparando secuencias de los dos polinucleótidos en un «espectro de comparación» para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Un «espectro de comparación» hace referencia a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, normalmente alrededor de 50 a alrededor de 100, más normalmente alrededor de 100 a alrededor de 150, en las cuales una secuencia se compara con una secuencia de referencia con la misma cantidad de posiciones contiguas luego de haber alineado las dos secuencias de manera óptima. El espectro de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) de alrededor de 20 % o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencia para alineación de un espectro de comparación puede realizarse mediante implementaciones computarizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics

edición 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive
Madison, WI, EUA) o mediante inspección y la mejor alineación
(es decir, que produce el mayor porcentaje de homología en el
espectro de comparación) que se genera mediante cualquiera de
5 los métodos seleccionados. También se puede hacer referencia a
la familia BLAST de programas, por ejemplo, como se describe en
Altschul *et ál.*, 1997, *Nucl. Acids Res.* 25:3389. Se puede
encontrar una mención detallada del análisis de secuencia en la
unidad 19.3 de Ausubel *et ál.*, *Current Protocols in Molecular*
10 *Biology*, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, capítulo 15.

Tal como se utiliza en la presente, «polinucleótido aislado»
hace referencia a un polinucleótido purificado a partir de las
secuencias que lo flanquean en un estado natural, p. ej., un
15 fragmento de ADN eliminado de las secuencias normalmente
adyacentes al fragmento. Un «polinucleótido aislado» también
hace referencia a un ADN complementario (ADNc), un ADN
recombinante u otro polinucleótido que no existe en la
naturaleza y que se realizó manualmente.

20

Los términos que describen la orientación de los
polinucleótidos incluyen: 5' (normalmente el extremo del
polinucleótido con un grupo fosfato libre) y 3' (normalmente el
extremo del polinucleótido con un grupo hidroxilo (OH) libre).

Las secuencias de polinucleótidos se pueden anotar en la orientación 5' a 3' o en la orientación 3' a 5'. Para el ADN y el ARNm, la cadena 5' a 3' se indica como la cadena «sentido», «más» o «de codificación» debido a que su secuencia es idéntica a la secuencial del premensajero (ARN_{prem}) [salvo por uracilo (U) en el ARN, en lugar de timina (T) en el ADN]. Para el ADN y el ARNm, la cadena 3' a 5' complementaria que es la cadena transcripta por la ARN polimerasa se indica como cadena «plantilla», «antisentido», «menos» o «no codificante». Tal como se utiliza en la presente, el término «orientación inversa» hace referencia a una secuencia 5' a 3' escrita en la orientación 3' a 5' o una secuencia 3' a 5' escrita en la orientación 5' a 3'.

Los términos «complementario» y «complementariedad» se refieren a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las normas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, la cadena complementaria de la secuencia de ADN 5' A G T C A T G 3' es 3' T C A G T A C 5'. La última secuencia a menudo se escribe como el complemento inverso con el extremo 5' a la izquierda y el extremo 3' a la derecha, 5' C A T G A C T 3'. Una secuencia igual a su complemento inverso se dice que es una secuencia palindrómica. La complementariedad puede ser «parcial», en la que solo algunas de las bases de ácidos

nucleicos se emparejan de acuerdo con las normas de emparejamiento de bases. O puede haber complementariedad «completa» o «total» entre los ácidos nucleicos.

5 Asimismo, los expertos en la técnica observarán que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido o fragmento de variante de este, tal como se describe en la presente. Algunos de estos polinucleótidos poseen una homología
10 mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen natural. No obstante, los polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codones están contemplados específicamente en la presente invención, por ejemplo, los polinucleótidos optimizados para la selección de codones
15 humanos y/o de primates. Asimismo, también se pueden utilizar alelos de los genes que comprendan las secuencias de polinucleótidos que se brindan en la presente. Los alelos son genes endógenos alterados como resultado de una o más mutaciones, como eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de
20 nucleótidos.

El término «casete de ácido nucleico», tal como se utiliza en la presente, hace referencia a secuencias genéticas dentro de un vector que pueda expresar un ARN y, posteriormente, una

proteína. El casete de ácido nucleico contiene el gen de interés, p. ej., un CAR. El casete de ácido nucleico se orienta, en su posición y secuencia, dentro del vector de modo que el ácido nucleico en el casete se pueda transcribir hacia el ARN y, cuando sea necesario, traducirse en una proteína o un polipéptido y experimentar modificaciones postraduccionales adecuadas necesarias para la actividad en la célula transformada y translocalizarse hacia el compartimiento adecuado para la actividad biológica, dirigiéndose hacia los compartimientos intracelulares adecuados o mediante secreción en compartimientos extracelulares. Preferentemente, el casete tiene sus extremos 3' y 5' adaptados para fácil inserción en un vector, p. ej., tiene lugares de restricción de endonucleasa en cada extremo. En una modalidad preferida de la invención, el casete de ácido nucleico contiene la secuencia de un receptor de antígeno quimérico que se utiliza para tratar una neoplasia de células B. El casete se puede retirar e insertar en un vector plásmido o viral como una única unidad.

En modalidades particulares, los polinucleótidos incluyen al menos un polinucleótido de interés. Tal como se utiliza en la presente, el término «polinucleótido de interés» hace referencia a un polinucleótido que codifica un polipéptido (es decir, un polipéptido de interés) que se inserta en un vector

de expresión que se desea expresar. Un vector puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 polinucleótidos de interés. En determinadas modalidades, el polinucleótido de interés codifica un polipéptido que brinda un efecto terapéutico en el

5 tratamiento o la prevención de una enfermedad o un trastorno. Los polinucleótidos de interés y los polipéptidos que se codifican a partir de estos incluyen tanto polinucleótidos que codifican polipéptidos de tipo salvaje, como variantes funciones y fragmentos de estos. En modalidades particulares,

10 una variante funcional tiene al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % de identidad con un polinucleótido de referencia o una secuencia de polipéptidos de tipo salvaje correspondientes. En determinadas modalidades, una variante funcional o fragmento tiene al menos 50 %, al menos 60 %, al

15 menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 % de una actividad biológica de un polipéptido de tipo salvaje correspondiente.

En una modalidad, el polinucleótido de interés no codifica un polipéptido sino que sirve como plantilla para transcribir

20 miARN, ARNip o ARNhc, ribozimas u otro ARN inhibidor. En otras diversas modalidades, un polinucleótido comprende un polinucleótido de interés que codifica un CAR y uno o más polinucleótidos de interés adicionales que incluyen, de modo no taxativo, una secuencia de ácido nucleico inhibidora que

incluye, de modo no taxativo: un ARNip, un miARN, un ARNhc y un ribozima.

Tal como se utilizan en la presente, los términos «ARNip» o
5 «ARN interferente pequeño» hace referencia a una secuencia corta de polinucleótidos que media un proceso de silenciamiento génico postraducción específico de la secuencia, inhibición de traducción, inhibición de transcripción o iARN epigenética en animales (Zamore *et ál.*, 2000, *Cell*, 101, 25-33; Fire *et ál.*,
10 1998, *Nature*, 391, 806; Hamilton *et ál.*, 1999, *Science*, 286, 950-951; Lin *et ál.*, 1999, *Nature*, 402, 128-129; Sharp, 1999, *Genes & Dev.*, 13, 139-141 y Strauss, 1999, *Science*, 286, 886). En determinadas modalidades, un ARNip comprende una primera cadena y una segunda cadena con la misma cantidad de
15 nucleósidos. No obstante, la primera y la segunda cadena se encuentran desfasadas de modo que los dos nucleósidos terminales en la primera y la segunda cadena no se emparejen con un residuo en la cadena complementaria. En determinados casos, los dos nucleósidos no emparejados son residuos de
20 timidina. El ARNip debería incluir una región de suficiente homología con un gen objetivo y tener una longitud suficiente en cuanto a los nucleótidos como para que el ARNip o un fragmento de este pueda mediar la regulación en disminución del gen objetivo. Por lo tanto, un ARNip incluye una región al

menos parcialmente complementaria del ARN objetivo. No es necesario que haya una complementariedad perfecta entre el ARNip y el objetivo, pero la correspondencia debe ser suficiente para permitir que el ARNip o un producto de escisión de este dirijan el silenciamiento específico de secuencia, como mediante escisión de iARN del ARN objetivo. La complementariedad o el grado de homología con la cadena objetivo es más crucial en la cadena antisentido. Si bien a menudo se desea una complementariedad perfecta, en particular en la cadena antisentido, algunas modalidades incluyen uno o más, pero preferentemente 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 o menos errores de emparejamiento con respecto al ARN objetivo. Los errores de emparejamiento se toleran mejor en las regiones terminales y, si se encuentran presentes, se prefieren en una o más regiones terminales, p. ej., dentro de 6, 5, 4 o 3 nucleótidos del extremo 5' y/o 3'. La cadena sentido solo debe ser suficientemente complementaria de la cadena antisentido como para mantener el carácter general de cadena doble de la molécula.

20

Asimismo, un ARNip puede encontrarse modificado o incluir análogos de nucleósidos. Las regiones de cadena simple de un ARNip se pueden modificar o pueden incluir análogos de nucleósidos, p. ej., la región o las regiones no emparejadas de

una estructura horquillada, p. ej., una región que vincule dos regiones complementarias, puede tener modificaciones o análogos de nucleósidos. También es útil la modificación para estabilizar uno o más extremos 3' o 5' de un ARNip, p. ej.,
 5 contra exonucleasas, o para favorecer el ingreso del agente de ARNip antisentido en RISC. Las modificaciones pueden incluir enlazadores amino C3 (o C6, C7, C12), enlazadores tiol, enlazadores carboxilo, separadores no nucleotídicos (C3, C6, C9, C12, abásicos, trietilenglicol, hexaetilenglicol),
 10 reactivos de fluoresceína o biotina especiales que se presentan como fosforamiditas y que tienen otro grupo hidroxilo protegido con DMT, lo cual permite múltiples acoplamientos durante la síntesis de ARN. Cada cadena de un ARNip puede tener una longitud igual o menor a 30, 25, 24, 23, 22, 21 o 20
 15 nucleótidos. La cadena tiene preferentemente una longitud de al menos 19 nucleótidos. Por ejemplo, cada cadena puede tener una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos. Los ARNip preferidos tienen una región doble de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 pares de nucleótidos y uno o más excedentes de 2-3 nucleótidos,
 20 preferentemente uno o dos excedentes 3' de 2-3 nucleótidos.

Tal como se utilizan en la presente, los términos «miARN» o «microARN» hacen referencia a ARN pequeños no codificantes de 20-22 nucleótidos, típicamente extraídos de estructuras

precursoras de ARN de pliegue inverso de ~70 nucleótidos conocidas como pre-miARN. Los miARN regulan de forma negativa sus objetivos de una de dos formas, dependiendo del grado de complementariedad entre el miARN y el objetivo. Primero, los

5 miARN que se unen con una complementariedad perfecta o casi perfecta a las secuencias de ARNm que codifican proteína inducen la vía de interferencia mediada por ARN (iARN). Los miARN que ejercen sus efectos reguladores mediante unión con lugares complementarios imperfectos dentro de las regiones sin

10 traducción 3' (UTR, por su sigla en inglés) de sus objetivos de ARNm reprimen la expresión objetivo-gen tras la transcripción, aparentemente a nivel de la traducción, a través de un complejo RISC similar o posiblemente idéntico al que se utiliza para la vía de iARN. De forma coherente con el control de traducción,

15 los miARN que utilizan este mecanismo reducen los niveles de proteína de sus genes objetivo, pero los niveles de ARNm de estos genes solamente se ven afectados de forma mínima. Los miARN comprenden tanto miARN de origen natural como miARN diseñados de forma artificial que pueden dirigirse de forma

20 específica a cualquier secuencia de ARNm. Por ejemplo, en una modalidad, el experto en la técnica puede diseñar construcciones de ARN horquillado corto expresadas como transcripciones primarias de miARN humano (p. ej., miR-30 o miR-21). Este diseño agrega un lugar de procesamiento Drosha a

la construcción horquillada y ha demostrado aumentar en gran medida la eficacia del silenciamiento (Pusch *et ál.*, 2004). El tallo horquillado consiste en 22 nt de ARNcd (p. ej., la antisentido tiene complementariedad perfecta con el objetivo deseado) y un bucle de 15-19 nt de un miR humano. La adición del bucle de miR y las secuencias flanqueantes de miR30 a cada uno o ambos lados de la horquilla produce un aumento de más de 10 veces en el procesamiento de Drosha y Dicer de las horquillas expresadas, en comparación con los diseños de ARNhc convencionales sin microARN. El mayor procesamiento de Drosha y Dicer se traduce en mayor producción de ARNip/miARN y mayor potencia para las horquillas expresadas.

Tal como se utilizan en la presente, los términos «ARNhc» o «ARN horquillado corto» hacen referencia a una estructura de cadena doble que se forma mediante una única cadena de ARN autocomplementaria. Para la inhibición se prefieren las construcciones de ARNhc con una secuencia de nucleótidos idéntica a una parte de la secuencia de codificación o no codificante del gen objetivo. También se ha descubierto que las secuencias de ARN con inserciones, eliminaciones y mutaciones de un solo punto con respecto a la secuencia objetivo son eficaces para la inhibición. Se prefiere una identidad de secuencia mayor al 90 % o incluso una identidad de secuencia

del 100 % entre el ARN inhibidor y la parte del gen objetivo. En determinadas modalidades preferidas, la longitud de la parte de formación de estructuras dobles de un ARNhc es de al menos 20, 21 o 22 nucleótidos de longitud, p. ej., correspondiente en tamaño a productos de ARN producidos mediante escisión dependiente de Dicer. En determinadas modalidades, la construcción de ARNhc tiene una longitud de al menos 25, 50, 100, 200, 300 o 400 bases. En determinadas modalidades, la construcción de ARNhc tiene una longitud de 400-800 bases. Las construcciones de ARNhc tienen una gran tolerancia a la variación en la secuencia de bucle y el tamaño del bucle.

Tal como se utiliza en la presente, el término «ribozima» hace referencia a una molécula de ARN catalíticamente activa que puede escindir de forma específica del lugar un ARNm objetivo. Se han descrito diversos subtipos, p. ej., ribozimas de cabeza de martillo y horquilladas. La estabilidad y la actividad catalítica de las ribozimas pueden mejorar mediante sustitución de ribonucleótidos por desoxirribonucleótidos en bases no catalíticas. Si bien pueden utilizarse ribozinas que escinden el ARNm en secuencias de reconocimiento específicas del lugar para destruir ARNm particulares, se prefiere el uso de ribozimas de cabeza de martillo. Las ribozimas de cabeza de martillo escinden ARNm en ubicaciones indicadas por regiones

flanqueantes que forman pares de bases complementarios con el ARNm objetivo. El único requisito es que el ARNm objetivo tenga las siguientes secuencias de dos bases: 5'-UG-3'. En la técnica se conocen la construcción y producción de ribozimas de cabeza
5 de martillo.

Un método preferido de suministro de un polinucleótido de interés que comprende un ARNip, un miARN, un ARNhc o una ribozima comprende una o más secuencias reguladoras como, por
10 ejemplo, un pol III constitutivo fuerte, p. ej., un promotor de ARNnp U6 humano, el promotor de ARNnp U6 de ratón, el promotor de ARN H1 humano y de ratón y el promotor de ARNt-val humano o un promotor de pol II constitutivo fuerte, como se describe en otro punto en la presente.

15

Los polinucleótidos de la presente invención, independientemente de la longitud de la secuencia de codificación en sí misma, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, como promotores y/o potenciadores, regiones
20 sin traducción (UTR), secuencias de señal, secuencias de Kozak, señales de poliadenilación, lugares enzimáticos de restricción adicionales, lugares de clonación múltiple, lugares de ingreso ribosómico interno (IRES, por su sigla en inglés), lugares de reconocimiento de recombinasa (p. ej., LoxP, FRT y lugares

Att), codones de terminación, señales de terminación de transcripción y polinucleótidos que codifican polipéptidos de autoescisión, etiquetas epitópicas, como se describe en otro punto en la presente o como se conoce en la técnica, de modo
5 que su longitud global puede variar de forma considerable. Por lo tanto, se contempla que se puede utilizar un fragmento de polinucleótido de casi cualquier longitud, con la longitud total preferentemente limitada por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante deseado.

10

Los polinucleótidos se pueden preparar, manipular y/o expresar utilizando cualquiera de diversas técnicas establecidas conocidas y disponibles en la técnica. Para expresar un polipéptido deseado, se puede insertar una secuencia de
15 nucleótidos que codifique el polipéptido en un vector adecuado. Los ejemplos de vectores son plásmidos, secuencias de replicación autónoma y elementos transponibles. Otros ejemplos de vectores incluyen, de modo no taxativo, plásmidos, fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales como cromosoma
20 artificial de levadura (YAC, por su sigla en inglés), cromosoma artificial bacteriano (BAC, por su sigla en inglés) o cromosoma artificial derivado de P1 (PAC, por su sigla en inglés), bacteriófagos como fago lambda o fago M13 y virus animales. Los ejemplos de categorías de virus animales útiles como vectores

incluyen, de modo no taxativo, retrovirus (incluido lentivirus), adenovirus, virus asociado con adeno, herpesvirus (p. ej., virus de herpes simple), poxvirus, baculovirus, papilomavirus y papovavirus (p. ej., SV40). Los ejemplos de
5 vectores de expresión son vectores pClneo (Promega) para expresión en células mamíferas, pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ y pLenti6.2/V5-GW/lacZ (Invitrogen) para transferencia y expresión mediadas por lentivirus en células mamíferas. En modalidades particulares, las secuencias de codificación de las
10 proteínas quiméricas descritas en la presente se pueden ligar en dichos vectores de expresión para expresión de la proteína quimérica en células mamíferas.

En una modalidad, un vector que codifica un CAR contemplado en
15 la presente comprende la secuencia de polinucleótidos que se indica en la SEQ ID NO: 36.

En modalidades particulares, el vector es un vector episomal o un vector que se mantiene de forma extracromosómica. Tal como
20 se utiliza en la presente, el término «episomal» hace referencia a un vector que puede replicarse sin integración en el ADN cromosómico del hospedador y sin pérdida gradual de una célula hospedadora en división, lo cual también significa que dicho vector se replica de forma extracromosómica o episomal.

El vector se modifica genéticamente para contener la secuencia que codifica el origen de replicación del ADN u «ori» de un virus linfotrófico del herpes o un herpesvirus gamma, un adenovirus, SV40, un virus de papiloma bovino o una levadura, especialmente un origen de replicación de un virus linfotrófico del herpes o un herpesvirus gamma correspondiente a oriP de EBV. En un aspecto particular, el virus linfotrófico del herpes puede ser virus de Epstein Barr (EBV), virus del herpes de sarcoma Kaposi (KSHV), virus del herpes saimiri (HS) o virus de enfermedad de Marek (MDV). El virus de Epstein Barr (EBV) y el virus del herpes de sarcoma Kaposi (KSHV) también son ejemplos de un herpesvirus gamma. Típicamente, la célula hospedadora comprende la proteína transactivadora de replicación viral que activa la replicación.

15

Los «elementos de control» o «secuencias reguladoras» presentes en un vector de expresión son las regiones no traducidas del vector-origen de replicación, casetes de selección, promotores, potenciadores, intrones de señales de inicio de traducción (secuencia de Shine Dalgarno o secuencia de Kozak), una secuencia de poliadenilación, regiones sin traducción 5' y 3'- que interactúan con las proteínas celulares hospedadoras para realizar la transcripción y traducción. Estos elementos pueden variar en su fuerza y especificidad. Dependiendo del sistema de

20

vectores y el hospedador utilizados, se puede usar cualquier cantidad de elementos de transcripción y traducción adecuados, incluidos promotores ubicuos y promotores inducibles.

5 En modalidades particulares, un vector para uso en la práctica de la invención que incluye, de modo no taxativo, vectores de expresión y vectores virales, incluirá secuencias de control exógenas, endógenas o heterólogas, como promotores y/o potenciadores. Una secuencia de control «endógena» es una
10 naturalmente enlazada con un gen específico en el genoma. Una secuencia de control «exógena» es una que se coloca en yuxtaposición con un gen mediante manipulación genética (es decir, técnicas de biología molecular), de modo que la transcripción de ese gen se dirija mediante el
15 promotor/potenciador enlazado. Una secuencia de control «heteróloga» es una secuencia exógena de una especie diferente a la célula que se manipula de forma genética.

El término «promotor», tal como se utiliza en la presente, hace
20 referencia a un lugar de reconocimiento de un polinucleótido (ADN o ARN) al que se une una polimerasa del ARN. Una polimerasa del ARN inicia y transcribe polinucleótidos enlazados de forma operativa al promotor. En modalidades particulares, los promotores operativos en células mamíferas

comprenden una región rica en AT ubicada aproximadamente 25 a 30 bases corriente arriba del lugar en el que se inicia la transcripción y/u otra secuencia que se encuentra 70 a 80 bases corriente arriba del inicio de la transcripción, una región
5 CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido.

El término «potenciador» hace referencia a un segmento de ADN que contiene secuencias que pueden brindar una mejor transcripción y, en algunos casos, pueden funcionar de forma
10 independiente de su orientación con respecto a otra secuencia de control. Un potenciador puede funcionar de forma cooperativa o adicional con promotores y/u otros elementos del potenciador. El término «promotor/potenciador» hace referencia a un segmento de ADN que contiene secuencias que pueden brindar tanto
15 funciones promotoras como potenciadoras.

El término «enlazado de forma operativa» hace referencia a una yuxtaposición en la que los componentes descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar de la forma
20 pretendida. En una modalidad, el término hace referencia a un enlace funcional entre una secuencia de control de expresión de ácido nucleico (como un promotor y/o un potenciador) y una segunda secuencia de polinucleótidos, p. ej., un polinucleótido de interés, en el que la secuencia de control de expresión

dirige la transcripción del ácido nucleico que corresponde a la segunda secuencia.

Tal como se utiliza en la presente, el término «secuencia de control de expresión constitutiva» hace referencia a un promotor, potenciador o promotor/potenciador que permite de forma continua o ininterrumpida la transcripción de una secuencia enlazada de forma operativa. Una secuencia de control de expresión constitutiva puede ser un promotor, potenciador o promotor/potenciador «ubícuo» que permita la expresión en diversos tipos de células y tejidos o un promotor, potenciador o promotor/potenciador «específico de la célula», «específico del tipo de célula», «específico del linaje celular» o «específico del tejido» que permita la expresión en una variedad limitada de tipos de células y tejidos, respectivamente.

Las secuencias de control de expresión ubicuas ilustrativas adecuadas para uso en modalidades particulares de la invención incluyen, de modo no taxativo, un promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), un virus simio viral 40 (SV40) (p. ej., temprano o tardío), un promotor LTR de virus de leucemia murina Moloney (MoMLV, por su sigla en inglés), un LTR de virus de sarcoma Rous (RSV), un promotor de virus de herpes simple

(HSV) (timidina cinasa), promotores H5, P7.5 y P11 de virus vaccinia, un promotor del factor de elongación 1-alfa (FE1a, por su sigla en inglés), respuesta temprana al crecimiento 1 (EGR1, por su sigla en inglés), ferritina H (FerH), ferritina L (FerL), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenada (GAPDH, por su sigla en inglés), factor de inicio de traducción eucariota 4A1 (EIF4A1, por su sigla en inglés), proteína de choque calórico de 70 kDa 5 (HSPA5, por su sigla en inglés), proteína de choque término de 90 kDa beta miembro 1 (HSP90B1, por su sigla en inglés), proteína de choque término de 70 kDa (HSP70, por su sigla en inglés), β -cinesina (β -KIN), el locus ROSA 26 humano (Irions *et ál.*, *Nature Biotechnology* 25, 1477 - 1482 (2007)), un promotor de ubiquitina C (UBC), un promotor de fosfoglicerato cinasa-1 (PGK, por su sigla en inglés), un potenciador de citomegalovirus/promotor de β -actina de pollo (CAG), un promotor de β -actina y un potenciador de virus sarcoma mieloproliferativo, promotor sustituido en el lugar de unión al cebador dl587rev (MND) con región de control negativo eliminada (Challita *et ál.*, *J Virol.* 69(2):748-55 (1995)).

20

En una modalidad, un vector de la invención comprende un promotor de MND.

En una modalidad, un vector de la invención comprende un

promotor de EF1a que comprende el primer intrón del gen EF1a humano.

En una modalidad, un vector de la invención comprende un
5 promotor de EF1a que carece del primer intrón del gen EF1a humano.

En una modalidad particular, puede ser deseable la expresión de un polinucleótido que comprenda un CAR de un promotor
10 específico de células T.

Tal como se utiliza en la presente, «expresión condicional» puede hacer referencia a cualquier tipo de expresión condicional que incluye, de modo no taxativo, expresión
15 inducible, expresión reprimible, expresión en células o tejidos con un estado fisiológico, biológico o de enfermedad particular, etc. Esta definición no pretende excluir la expresión específica de un tejido o tipo celular. Determinadas modalidades de la invención brindan expresión condicional de un
20 polinucleótido de interés, p. ej., la expresión se controla sometiendo a una célula, un tejido, un organismo, etc., a un tratamiento o una condición que provoque la expresión del polinucleótido o que genere un aumento o una disminución en la expresión del polinucleótido codificado por el polinucleótido

de interés.

Los ejemplos ilustrativos de promotores/sistemas inducibles incluyen, de modo no taxativo, promotores inducibles por esteroides como promotores para genes que codifican receptores de glucocorticoides o estrógenos (inducibles mediante tratamiento con la hormona correspondiente), promotor de metalotionina (inducible mediante tratamiento con diversos metales pesados), promotor de MX-1 (inducible mediante interferón), el sistema regulable por mifepristona «GeneSwitch» (Sirin et ál., 2003, *Gene*, 323:67), el interruptor génico inducible mediante cumato (WO 2002/088346), sistemas reguladores dependientes de tetraciclina, etc.

La expresión condicional también se puede lograr utilizando una recombinasa de ADN específica del lugar. De acuerdo con determinadas modalidades de la invención, el vector comprende al menos uno (típicamente dos) lugar/es para recombinación mediada por una recombinasa específica del lugar. Tal como se utilizan en la presente, los términos «recombinasa» o «recombinasa específica del lugar» incluyen proteínas, enzimas o factores conjuntos de integración o escisión o proteínas asociadas implicadas en reacciones de recombinación que implican uno o más lugares de recombinación (p. ej., dos, tres,

cuatro, cinco, siete, diez, doce, quince, veinte, treinta, cincuenta, etc.), que pueden ser proteínas de tipo salvaje (remitirse a Landy, Current Opinion in Biotechnology 3:699-707 (1993)) o mutantes, derivados (p. ej., proteínas de fusión con
5 las secuencias de proteínas de recombinación o fragmentos de estas), fragmentos y variantes de estos. Los ejemplos ilustrativos de recombinasas adecuadas para uso en modalidades particulares de la presente invención incluyen, de modo no taxativo: Cre, Int, IHF, Xis, Flp, Fis, Hin, Gin, Φ C31, Cin,
10 Tn3 resolvasa, TndX, XerC, XerD, TnpX, Hjc, Gin, SpCCE1 y ParA.

Los vectores pueden comprender uno o más lugares de recombinación para cualquiera de diversas recombinasas específicas del lugar. Se debe comprender que el lugar objetivo
15 para una recombinasa específica del lugar se suma a cualquier lugar o lugares necesarios para integración a un vector, p. ej., un vector retroviral o vector lentiviral. Tal como se utilizan en la presente, los términos «secuencia de recombinación», «lugar de recombinación» o «lugar de
20 recombinación específico del lugar» hacen referencia a una secuencia de ácido nucleico particular que reconoce y la cual se une una recombinasa.

Por ejemplo, un lugar de recombinación para Cre recombinasa es

loxP, que es una secuencia de 34 pares de bases con dos repeticiones invertidas de 13 pares de bases (que sirven como lugares de unión de recombinasa) que flanquean una secuencia de núcleo de 8 pares de bases (remitirse a la figura 1 de Sauer, B., *Current Opinion in Biotechnology* 5:521-527 (1994)). Otros ejemplos de lugares loxP incluyen, de modo no taxativo: lox511 (Hoess et ál., 1996; Bethke y Sauer, 1997), lox5171 (Lee y Saito, 1998), lox2272 (Lee y Saito, 1998), m2 (Langer et ál., 2002), lox71 (Albert et ál., 1995) y lox66 (Albert et ál., 1995).

Los lugares de reconocimiento adecuados para la recombinasa FLP incluyen, de modo no taxativo: FRT (McLeod, et ál., 1996), F₁, F₂, F₃ (Schlake y Bode, 1994), F₄, F₅ (Schlake y Bode, 1994), FRT(LE) (Senecoff et ál., 1988), FRT(RE) (Senecoff et ál., 1988).

Otros ejemplos de secuencias de reconocimiento son las secuencias attB, attP, attL y attR, que se reconocen mediante la enzima λ Integrasa, p. ej., phi-c31. El SSR ϕ C31 media la recombinación solamente entre los lugares heterotípicos attB (34 pb de longitud) y attP (39 pb de longitud) (Groth et ál., 2000). attB y attP, denominadas según el lugar de unión a la integrasa del fago en los genomas bacterianos y fágicos,

respectivamente, ambas contienen repeticiones invertidas imperfectas probablemente unidas mediante homodímeros ϕ C31 (Groth et ál., 2000). Los lugares del producto, attL y attR, son eficazmente inertes a una mayor recombinación mediada por ϕ C31 (Belteki et ál., 2003), lo cual hace que la reacción sea irreversible. Para inserciones de catalización, se ha descubierto que el ADN con attB se inserta en un lugar attP genómico con mayor facilidad que un lugar de attP en un lugar de attB genómico (Thyagarajan et ál., 2001; Belteki et ál., 2003). Por lo tanto, las estrategias típicas colocan, mediante recombinación homóloga, un «lugar de acoplamiento» con attP en un locus definido, que luego se asocia con una secuencia entrante con attB para inserción.

Tal como se utiliza en la presente, un «lugar de ingreso de ribosoma interno» o «IRES» hace referencia a un elemento que promueve el ingreso directo de ribosoma interno al codón de inicio, como ATG, de un cistron (una región de codificación de proteína), con lo cual se conduce a la traducción del gen independiente del casquete. Remitirse, p. ej., a Jackson et ál., 1990. *Trends Biochem Sci* 15(12):477-83) y Jackson y Kaminski. 1995. *RNA* 1(10):985-1000. En modalidades particulares, los vectores contemplados por la invención incluyen uno o más polinucleótidos de interés que codifican uno

o más polipéptidos. En modalidades particulares, para lograr una traducción eficaz de cada uno de los múltiples polipéptidos, las secuencias de polinucleótidos pueden separarse mediante una o más secuencias IRES o secuencias de
5 polinucleótidos que codifican polipéptidos de autoescisión.

Tal como se utiliza en la presente, el término «secuencia de Kozak» hace referencia a una secuencia de nucleótidos corta que facilita en gran medida la unión inicial de ARNm a la subunidad
10 pequeña del ribosoma y aumenta la traducción. La secuencia de Kozak de consenso es (GCC)RCCATGG, en la que R es una purina (A o G) (Kozak, 1986. *Cell*. 44(2):283-92 y Kozak, 1987. *Nucleic Acids Res.* 15(20):8125-48). En modalidades particulares, los vectores contemplados por la invención comprenden
15 polinucleótidos con una secuencia Kozak de consenso y que codifican un polipéptido deseado, p. ej., un CAR.

En algunas modalidades de la invención, un polinucleótido o una célula que contiene el polinucleótido utiliza un gen suicida,
20 incluido un gen suicida inducible para reducir el riesgo de toxicidad directa y/o proliferación descontrolada. En aspectos específicos, el gen suicida no es inmunogénico del hospedador que contiene el polinucleótido o la célula. Un determinado ejemplo de un gen suicida que se puede utilizar es caspasa-9 o

caspasa-8 o citosina desaminasa. La caspasa-9 puede activarse utilizando un inductor químico específico de dimerización (CID, por su sigla en inglés).

5 En determinadas modalidades, los vectores comprenden segmentos de genes que hacen que las células efectoras inmunes de la invención, p. ej., células T, sean susceptibles a selección negativa in vivo. «Selección negativa» significa que se puede eliminar la célula infundida como resultado de un cambio en la
10 condición in vivo del individuo. El fenotipo seleccionable negativo puede surgir de la inserción de un gen que confiera sensibilidad a un agente administrado, por ejemplo, un compuesto. En la técnica se conocen los genes seleccionables negativos e incluyen, entre otros, los siguientes: el gen de
15 timidina cinasa del virus de herpes simple tipo I (HSV-I TK, por su sigla en inglés) (Wigler et ál., Cell 11:223, 1977) que confiere sensibilidad al ganciclovir, el gen de hipoxantina fosfirribosiltransferasa (HPRT, por su sigla en inglés) celular, el gen de adenina fosforribosiltransferasa (APRT, por
20 su sigla en inglés) celular y la citosina desaminasa bacteriana (Mullen et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 89:33 (1992)).

En algunas modalidades, las células efectoras inmunes genéticamente modificadas, como células T, comprenden un

polinucleótido que comprende además un marcador positivo que permite la selección de células del fenotipo seleccionable negativo *in vitro*. El marcador seleccionable positivo puede ser un gen que, al introducirse en la célula, exprese un fenotipo

5 dominante que permita la selección positiva de células con el gen. En la técnica se conocen los genes de este tipo e incluyen, entre otros, el gen de higromicina-B fosfotransferasa (hph, por su sigla en inglés) que confiere resistencia a la higromicina B, el gen de aminoglucósido fosfotransferasa (neo o

10 aph) de Tn5 que codifica la resistencia al antibiótico G418, el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR), el gen de adenosina desaminasa (ADA) y el gen de resistencia a múltiples fármacos (MDR, por su sigla en inglés).

15 Preferentemente, el marcador seleccionable positivo y el elemento seleccionable negativo se encuentran enlazados de modo que la pérdida del elemento seleccionable negativo también esté necesariamente acompañada por pérdida del marcador seleccionable positivo. De forma incluso más preferible, los

20 marcadores seleccionables positivo y negativo se fusionan para que la pérdida de uno obligatoriamente lleve a pérdida del otro. Un ejemplo de polinucleótidos fusionados que brindan como producto de expresión un polipéptido que confiere tanto las características de selección positivas como negativas deseadas

descritas anteriormente es un gen de fusión de timidina cinasa higromicina fosfotransferasa (HyTK). La expresión de este gen brinda un polipéptido que confiere resistencia a higromicina B para selección positiva in vitro y sensibilidad a ganciclovir para selección negativa in vivo. Remitirse a Lupton S. D., et ál, Mol. and Cell. Biology 1 1:3374- 3378, 1991. Asimismo, en modalidades preferidas, los polinucleótidos de la invención que codifican los receptores quiméricos se encuentran en vectores retrovirales que contienen el gen fusionado, en particular los que confieren resistencia a higromicina B para selección positiva in vitro y sensibilidad a ganciclovir para selección negativa in vivo, por ejemplo, el vector retroviral de HyTK descrito en Lupton, S. D. et ál. (1991), supra. Remitirse también a las publicaciones de PCT US91/08442 y PCT/US94/05601, de S. D. Lupton, que describen el uso de genes de fusión seleccionables bifuncionales derivados de la fusión de marcadores seleccionables positivos dominantes con marcadores seleccionables negativos.

Los marcadores seleccionables positivos preferidos se derivan de genes seleccionados del grupo que consiste en hph, nco y gpt y los marcadores seleccionables negativos preferidos se derivan de genes seleccionados del grupo que consiste en citosina desaminasa, HSV-I TK, VZV TK, HPRT, APRT y gpt. Los marcadores

especialmente preferidos son genes de fusión seleccionables bifuncionales en los que el marcador seleccionable positivo se deriva de hph o neo y el marcador seleccionable negativo se deriva de citosina desaminasa o un gen TK o marcador
5 seleccionable. Genes suicidas inducibles

F. VECTORES VIRALES

En modalidades particulares, una célula (p. ej., una célula efectora inmune) se transduce con un vector retroviral, p. ej.,
10 un vector lentiviral, que codifica un CAR. Por ejemplo, una célula efectora inmune se transduce con un vector que codifica un CAR que comprende un anticuerpo anti-BCMA murino o fragmento de unión al antígeno de este que se une a un polipéptido de BCMA con un dominio de señalización intracelular de CD3ζ, CD28,
15 4-1BB, Ox40 o cualquier combinación de estos. Por lo tanto, estas células transducidas pueden provocar una respuesta citotóxica mediada por CAR.

Los retrovirus son una herramienta común para suministro génico
20 (Miller, 2000, *Nature*. 357: 455:-460). En modalidades particulares, se utiliza un retrovirus para suministrarle un polinucleótido que codifique un receptor de antígeno quimérico (CAR) a una célula. Tal como se utiliza en la presente, el término «retrovirus» hace referencia a un virus de ARN que

transcribe de forma inversa su ARN genómico en una copia de ADN de cadena doble lineal y, posteriormente, integra de forma covalente su ADN genómico en un genoma hospedador. Una vez que el virus se integra en el genoma hospedador, este se denomina

5 «provirus». El provirus sirve como plantilla para la polimerasa de ARN II y dirige la expresión de moléculas de ARN que codifican proteínas y enzimas estructurales necesarias para producir nuevas partículas virales.

10 Los retrovirus ilustrativos adecuados para uso en modalidades particulares incluyen, de modo no taxativo: virus de leucemia murina de Moloney (M-MuLV, por su sigla en inglés), virus de sarcoma murino de Moloney (MoMSV), virus de sarcoma murino de Harvey (HaMuSV, por su sigla en inglés), virus de tumor

15 mamífero murino (MuMTV, por su sigla en inglés), virus de leucemia de primates gibones (GaLV, por su sigla en inglés), virus de leucemia felina (FLV, por su sigla en inglés), spumavirus, virus de leucemia murina de Friend, virus de células madres murinas (MSCV, por su sigla en inglés) y virus

20 de sarcoma Rous (RSV)) y lentivirus.

Tal como se utiliza en la presente, el término «lentivirus» hace referencia a un grupo (o género retrovirus complejos. Los lentivirus ilustrativos incluyen, de modo no taxativo: HIV

(virus de inmunodeficiencia humana, incluido HIV tipo 1 y HIV tipo 2), virus de visna-maedi (VMV), virus de artritis-encefalitis caprina (CAEV), virus de anemia infecciosa equina (EIAV), virus de inmunodeficiencia felina (FIB), virus de
5 inmunodeficiencia bovina (BIV) y virus de inmunodeficiencia simia (SIV). En una modalidad, se prefieren las estructuras principales del vector basado en VIH (es decir, elementos de secuencia de actuación en cis de HIV). En modalidades particulares, se utiliza un lentivirus para suministrarle un
10 polinucleótido con un CAR a una célula.

Los vectores retrovirales y, de forma más particular, vectores lentivirales, se pueden utilizar en la realización de modalidades particulares de la presente invención. Por
15 consiguiente, el término «retrovirus» o «vector retroviral», tal como se utiliza en la presente, pretende incluir «lentivirus» y «vectores lentivirales» respectivamente.

El término «vector» se utiliza en la presente para hacer
20 referencia a una molécula de ácido nucleico que puede transferir o transportar otra molécula de ácido nucleico. El ácido nucleico transferido generalmente se enlaza, p. ej., se inserta, en la molécula de ácido nucleico del vector. Un vector puede incluir secuencias que dirijan la replicación autónoma en

una célula o puede incluir secuencias suficientes para permitir la integración en el ADN de la célula hospedadora. Los vectores útiles incluyen, por ejemplo, plásmidos (p. ej., plásmidos de ADN o plásmidos de ARN), transposones, cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos y vectores virales. Los vectores virales útiles incluyen, p. ej., retrovirus y lentivirus defectivos de replicación.

Como será evidente para el experto en la técnica, el término «vector viral» se utiliza ampliamente para hacer referencia a una molécula de ácido nucleico (p. ej., un plásmido de transferencia) que incluye elementos de ácido nucleico derivados de virus que típicamente facilitan la transferencia de la molécula de ácido nucleico o su integración en el genoma de una célula o en una partícula viral que medie la transferencia de ácido nucleico. Las partículas virales típicamente incluirán diversos componentes virales y, en algunas oportunidades, también componentes de células hospedadores además de uno o más ácidos nucleicos.

20

El término vector viral puede hacer referencia a un virus o una partícula viral que pueda transferir un ácido nucleico a una célula o al ácido nucleico transferido en sí mismo. Los vectores virales y plásmidos de transferencia contienen

elementos genéticos funcionales y/o estructurales que se derivan principalmente de un virus. El término «vector retroviral» hace referencia a un vector viral o plásmido con elementos funcionales y estructurales, o partes de estos, que se derivan principalmente de un retrovirus. El término «vector lentiviral» hace referencia a un vector viral o plásmido con elementos funcionales y estructurales, o partes de estos, incluidos LTR, que se derivan principalmente de un lentivirus. El término «vector híbrido» hace referencia a un vector, LTR u otro ácido nucleico que contenga tanto secuencias retrovirales, p. ej., lentivirales, como secuencias virales no lentivirales. En una modalidad, un vector híbrido hace referencia a un vector o plásmido de transferencia que comprende secuencias retrovirales, p. ej., lentivirales, para transcripción inversa, replicación, integración y/o envoltura.

En modalidades particulares, los términos «vector lentiviral», «vector de expresión lentiviral» pueden utilizarse para hacer referencia a plásmidos de transferencia lentivirales y/o partículas lentivirales infecciosas. Cuando se hace referencia en la presente a elementos como lugares de clonación, promotores, elementos reguladores, ácidos nucleicos heterólogos, etc., se comprende que las secuencias de estos elementos se encuentran presentes en forma de ARN en las

partículas lentivirales de la invención y se encuentran presentes en forma de ADN en los plásmidos de ADN de la invención.

5 En cada extremo del provirus hay estructuras denominadas «repeticiones terminales largas» o «LTR». El término «repetición terminal larga (LTR, por su sigla en inglés)» hace referencia a dominios de pares de bases ubicados en los extremos de ADN retrovirales que, en su contexto de secuencia
10 natural, son repeticiones directas y contienen regiones U3, R y U5. Las LTR generalmente brindan funciones fundamentales para la expresión de genes retrovirales (p. ej., promoción, inicio y poliadenilación de transcripciones génicas) y para la replicación viral. La LTR contiene diversas señales reguladoras
15 que incluyen elementos de control de transcripción, señales de poliadenilación y secuencias necesarias para replicación e integración del genoma viral. La LTR viral se divide en tres regiones denominadas U3, R y U5. La región U3 contiene los elementos promotores y potenciadores. La región U5 es la
20 secuencia entre el lugar de unión al cebador y la región R y contiene la secuencia de poliadenilación. La región R (repetición) está flanqueada por las regiones U3 y U5. La LTR está compuesta por regiones U3, R y U5 y aparece en los extremos 5' y 3' del genoma viral. Adyacentes a la LTR 5' se

encuentran secuencias necesarias para transcripción inversa del genoma (el lugar de unión a cebador de ARNt) y envoltura eficaz de ARN viral en partículas (el lugar Psi).

5 Tal como se utiliza en la presente, el término «señal de envoltura» o «secuencia de envoltura» hace referencia a secuencias ubicadas dentro del genoma retroviral necesarias para inserción del ARN viral en la partícula o cápside viral, remitirse, p. ej., a Clever *et ál.*, 1995. *J. of Virology*, tomo
10 69, No. 4; pp. 2101-2109. Diversos vectores retrovirales utilizan la señal de envoltura mínima (también indicada como la secuencia psi [Ψ]) necesaria para encapsidación del genoma viral. Por lo tanto, tal como se utilizan en la presente, los términos «secuencia de envoltura», «señal de envoltura», «psi»
15 y el símbolo « Ψ » se utilizan en referencia a la secuencia no codificante necesaria para encapsidación de las cadenas de ARN retroviral durante la formación de la partícula viral.

En diversas modalidades, los vectores comprenden LTR 5' y/o LT
20 3' modificadas. Una cualquiera o ambas LTR pueden comprender una o más modificaciones que incluyen, de modo no taxativo, una o más eliminaciones, inserciones o sustituciones. Las modificaciones de la LTR 3' se realizan a menudo para mejorar la seguridad de sistemas lentivirales o retrovirales haciendo

que los virus sean defectuosos para la replicación. Tal como se utiliza en la presente, el término «defectuoso para la replicación» hace referencia a un virus que no puede completar una replicación eficaz, de modo que no se producen viriones infecciosos (p. ej., progenie lentiviral defectuosa para replicación). El término «competente para replicación» hace referencia a virus de tipo salvaje o virus mutante con capacidad de replicación, de modo que la replicación viral del virus permita la producción de viriones infecciosos (p. ej., progenie lentiviral competente para replicación).

Vectores «de autoinactivación» (SIN, por su sigla en inglés) hace referencia a vectores defectuosos para replicación, p. ej., vectores retrovirales o lentivirales, en los que la región promotora-potenciadora de la LTR derecha (3'), conocida como la región U3, se encuentra modificada (p. ej., mediante eliminación o sustitución) para evitar la transcripción viral más allá de la primera ronda de replicación viral. Esto se debe a que la región U3 de la LTR derecha (3') se utiliza como plantilla para la región U3 de la LTR izquierda (5') durante la replicación viral y, por lo tanto, la transcripción viral no se puede realizar sin el promotor-potenciador U3. En una modalidad adicional de la invención, la LTR 3' se modifica de modo que la región U5 se remplace, por ejemplo, con una secuencia de

poli(A) ideal. Cabe señalar que en la invención también se incluyen modificaciones en las LTR, como modificaciones de la LTR 3', la LTR 5' o las LTR 3' y 5'.

5 Se brinda un potenciamiento adicional de la seguridad mediante
reemplazo de la región U3 de la LTR 5' con un promotor
heterólogo para impulsar la transcripción del genoma viral
durante la producción de partículas virales. Los ejemplos de
promotores heterólogos que se pueden utilizar incluyen, por
10 ejemplo, promotores de virus simio viral 40 (SV40) (p. ej.,
temprano o tardío), citomegalovirus (CMV) (p. ej., temprano
inmediato), virus de leucemia murina de Moloney (MoMLV), virus
de sarcoma de Rous (RSV) y virus de herpes simple (HSV)
(timidina cinasa). Los promotores típicos pueden impulsar
15 niveles elevados de transcripción de forma independiente de
Tat. Este reemplazo reduce la posibilidad de la recombinación de
generar un virus competente para replicación, debido a que no
hay una secuencia U3 completa en el sistema de producción del
virus. En determinadas modalidades, el promotor heterólogo
20 tiene ventajas adicionales en el control de la forma en la que
se transcribe el genoma viral. Por ejemplo, el promotor
heterólogo puede ser inducible, de modo que la transcripción de
todo o parte del genoma viral se produzca solamente cuando se
encuentren presentes los factores de inducción. Los factores de

inducción incluyen, de modo no taxativo, uno o más compuestos químicos o las condiciones fisiológicas como la temperatura o el pH, en los cuales se cultivan las células hospedadoras.

5 En algunas modalidades, los vectores virales comprenden un elemento TAR. El término «TAR» hace referencia al elemento genético «de respuesta trans-activación» ubicado en la región R de LTR lentivirales (p. ej., HIV). Este elemento interactúa con el elemento genético trans-activador (tat) lentiviral para
10 potenciar la replicación viral. No obstante, este elemento no es necesario en las modalidades en las que la región U3 de la LTR 5' se reemplaza con un promotor heterólogo.

La «región R» hace referencia a la región dentro de las LTR
15 retrovirales que comienza al inicio del grupo de casquete (es decir, el inicio de la transcripción) y que finaliza inmediatamente antes del inicio de la extensión de poli A. La región R también se define como flanqueada por las regiones U3 y U5. La región R tiene incidencia durante la transcripción
20 inversa al permitir la transferencia de ADN naciente de un extremo del genoma al otro.

Tal como se utiliza en la presente, el término «elemento FLAP» hace referencia a un ácido nucleico cuya secuencia incluye la

extensión de polipurina central y las secuencias de terminación central (cPPT y CTS) de un retrovirus, p. ej., HIV-1 o HIV-2. Los elementos FLAP adecuados se describen en la patente estadounidense n.º 6,682,907 y en Zennou, *et ál.*, 2000, *Cell*, 5 101:173. Durante la transcripción inversa de HIV-1, el inicio central del ADN de cadena más en la extensión de polipurina central (cPPT) y la terminación central en la secuencia de terminación central (CTS, por su sigla en inglés) llevan a la formación de una estructura de ADN de cadena triple: el flap de 10 ADN central de HIV-1. Si bien no se desea limitarse a ninguna teoría, el flap de ADN puede actuar como un determinante activo en cis de la importación nuclear de genoma lentiviral y/o puede aumentar la titulación del virus. En modalidades particulares, las estructuras principales del vector retroviral o lentiviral 15 comprenden uno o más elementos FLAP corriente arriba o corriente abajo de los genes heterólogos de interés en los vectores. Por ejemplo, en modalidades particulares, un plásmido de transferencia incluye un elemento FLAP. En una modalidad, un vector de la invención comprende un elemento FLAP aislado de 20 HIV-1.

En una modalidad, los vectores de transferencia retroviral o lentiviral comprenden uno o más elementos de exportación. El término «elemento de exportación» hace referencia a un elemento

regulador postranscripción de actuación en cis que regula el transporte de una transcripción de ARN del núcleo al citoplasma de una célula. Los ejemplos de elementos de exportación de ARN incluyen, de modo no taxativo, el elemento de respuesta rev
5 (RRE, por su sigla en inglés) del virus de inmunodeficiencia humano (HIV) (remitirse, p. ej., a Cullen *et ál.*, 1991. *J. Virol.* 65: 1053 y Cullen *et ál.*, 1991. *Cell* 58: 423) y el elemento regulador postranscripción del virus B de hepatitis (HPRE, por su sigla en inglés). En general, el elemento de
10 exportación de ARN se coloca dentro de la UTR 3' de un gen y puede insertarse como una o múltiples copias.

En modalidades particulares, la expresión de secuencias heterólogas en vectores virales aumenta mediante incorporación
15 de elementos reguladores postranscripción, lugares de poliadenilación eficaces y, opcionalmente, señales de terminación de transcripción en los vectores. Diversos elementos reguladores postranscripción pueden aumentar la expresión de un ácido nucleico heterólogo en la proteína, p.
20 ej., el elemento regulador postranscripción del virus de hepatitis de la marmota (WPRE, Zufferey *et ál.*, 1999, *J. Virol.*, 73:2886), el elemento regulador postranscripción presente en el virus de hepatitis B (HPRE) (Huang *et ál.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:3864) y similares (Liu *et ál.*, 1995, *Genes Dev.*,

9:1766). En modalidades particulares, los vectores de la invención comprenden un elemento regulador postranscripción como un WPRE o HPRE.

5 En modalidades particulares, los vectores de la invención carecen de o no comprenden un elemento regulador postranscripción (PTE) como WPRE o HPRE dado que, en algunos casos, estos elementos aumentan el riesgo de transformación celular y/o no aumentan de forma sustancial o significativa la
10 cantidad de transcripción de ARNm o aumentan la estabilidad del ARNm. Por lo tanto, en algunas modalidades, los vectores de la invención carecen de o no comprenden un PTE. En otras modalidades, los vectores de la invención carecen de o no comprenden un WPRE o HPRE como medida de seguridad adicional.

15

Los elementos que dirigen la terminación y poliadenilación eficaces de las transcripciones de ácido nucleico heterólogo aumentan la expresión génica heteróloga. Las señales de terminación de transcripción se encuentran generalmente
20 corriente abajo de la señal de poliadenilación. En modalidades particulares, los vectores comprenden una secuencia de poliadenilación 3' de un polinucleótido que codifica un polipéptido que se debe expresar. El término «lugar de poli A» o «secuencia de poli A», tal como se usa en la presente, indica

una secuencia de ADN que dirige tanto la terminación como la poliadenilación de la transcripción del ARN naciente mediante ARN polimerasa II. Las secuencias de poliadenilación pueden promover la estabilidad del ARNm mediante adición de una cola de poliA en el extremo 3' de la secuencia de codificación y, por lo tanto, contribuir a una mayor eficacia de traducción. La poliadenilación eficaz de la transcripción recombinante es deseable, dado que las transcripciones que carecen de una cola de poli A son inestables y se degradan con rapidez. Los ejemplos ilustrativos de señales de poliA que se pueden utilizar en un vector de la invención incluyen una secuencia de poliA ideal (p. ej., AATAAA, ATTAAA, AGTAAA), una secuencia de poliA de la hormona de crecimiento bovina (BGHpA, por su sigla en inglés), una secuencia de poliA de β -globina de conejo (r β gpA, por su sigla en inglés) u otra secuencia de poliA endógena o heteróloga adecuada conocida en la técnica.

En determinadas modalidades, un vector retroviral o lentiviral comprende además uno o más elementos aislantes. Los elementos aislantes pueden contribuir con la protección de secuencias de expresión de lentivirus, p. ej., polipéptido terapéuticos, de efectos en lugares de integración que se pueden mediar con elementos de actuación en cis presentes en el ADN genómico y que llevan a una expresión desregulada de secuencias de

transferencia (es decir, efecto de colocación, remitirse, p. ej., a Burgess-Beusse *et ál.*, 2002, *Proc. Natl. Acad. Sci., EUA*, 99:16433 y Zhan *et ál.*, 2001, *Hum. Genet.*, 109:471). En algunas modalidades, los vectores de transferencia comprenden
5 uno o más elementos aislantes de la LTR 3' y, tras la integración del provirus en el genoma hospedador, el provirus comprende el o los aislantes en la LTR 5' o LTR3' mediante duplicación de la LTR 3'. Los aislantes adecuados para uso en la invención incluyen, de modo no taxativo, el aislante de β -
10 globina de pollo (remitirse a Chung *et ál.*, 1993. *Cell* 74:505; Chung *et ál.*, 1997. *PNAS* 94:575 y Bell *et ál.*, 1999. *Cell* 98:387, que se incorporan a la presente mediante esta referencia). Los ejemplos de elementos aislantes incluyen, de modo no taxativo, un aislante de un locus de β -globina, como
15 HS4 de pollo.

De acuerdo con determinadas modalidades específicas de la invención, la mayoría o todas las secuencias de estructura principal del vector viral se derivan de un lentivirus, p. ej.,
20 HIV-1. No obstante, se debe comprender que se pueden utilizar o combinar muchas fuentes diferentes de secuencias retrovirales y/o lentivirales o sustituciones y alteraciones diversas y en algunas de las secuencias lentivirales se pueden adaptar sin alterar la capacidad de un vector de transferencia de realizar

las funciones descritas en la presente. Asimismo, en la técnica se conocen diversos vectores lentivirales, remitirse a Naldini *et ál.*, (1996a, 1996b y 1998); Zufferey *et ál.*, (1997); Dull *et ál.*, 1998, patentes estadounidenses n.º 6,013,516 y 5,994,136, muchos de los cuales se pueden adaptar para producir un vector viral o plásmido de transferencia de la presente invención.

En diversas modalidades, los vectores de la invención comprenden un promotor enlazado de forma operativa a un polinucleótido que codifica un polipéptido de CAR. Los vectores pueden tener una o más LTR, en las que cualquiera de las LTR comprende una o más modificaciones, como una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos. Los vectores también pueden comprender uno o más elementos accesorios para aumentar la eficacia de la transducción (p. ej., un cPPT/FLAP), la envoltura viral (p. ej., una señal de envoltura Psi (Ψ), RRE) y/u otros elementos que aumenten la expresión génica terapéutica (p. ej., secuencias de poli (A)) y pueden comprender opcionalmente un WPRE o HPRE.

20

En una modalidad particular, el vector de transferencia de la invención comprende una LTR retroviral izquierda (5'), una extensión de polipurina central/flap de ADN (cPPT/FLAP), un elemento de exportación retroviral, un promotor activo en una

célula T enlazado de forma operativa a un polinucleótido que codifique un polipéptido de CAR contemplado en la presente y una LTR retroviral derecha (3') y, opcionalmente, un WPRE o HPRE.

5

En una modalidad particular, el vector de transferencia de la invención comprende una LTR retroviral izquierda (5'), un elemento de exportación retroviral, un promotor activo en una célula T enlazado de forma operativa a un polinucleótido que
10 codifique un polipéptido de CAR contemplado en la presente, una LTR retroviral derecha (3') y una secuencia de poli (A) y, opcionalmente, un WPRE o HPRE. En otra modalidad particular, la invención brinda un vector lentiviral que comprende: una LTR izquierda (5'), una cPPT/FLAP, un RRE, un promotor activo en
15 una célula T enlazado de forma operativa a un polinucleótido que codifique un polipéptido de CAR contemplado en la presente, una LTR derecha (3') y una secuencia de poliadenilación y, opcionalmente, un WPRE o HPRE.

20 En una modalidad determinada, la invención brinda un vector lentiviral que comprende: una LTR de HIV-1 izquierda (5'), una señal de envoltura Psi (Ψ), una cPPT/FLAp, un RRE, un promotor activo en una célula T enlazado de forma operativa a un polinucleótido que codifique un polipéptido de CAR contemplado

en la presente, una LTR de HIV-1 de autoinactivación (SIN) derecha (3') y una secuencia de poliadenilación de β -globina de conejo y, opcionalmente, un WPRE o HPRE.

5 En otra modalidad, la invención brinda un vector que comprende: al menos una LTR, una extensión de polipurina central/flap de ADN (cPPT/FLAP), un elemento de exportación retroviral y un promotor activo en una célula T enlazado de forma operativa a un polinucleótido que codifique un polipéptido de CAR
10 contemplado en la presente y, opcionalmente, un WPRE o HPRE.

En una modalidad particular, la invención brinda un vector que comprende al menos una LTR, una cPPT/FLAP, un RRE, un promotor activo en una célula T enlazado de forma operativa a un
15 polinucleótido que codifique un polipéptido de CAR contemplado en la presente y una secuencia de poliadenilación y, opcionalmente, un WPRE o HPRE.

En una modalidad determinada, la presente invención brinda al
20 menos una LTR de HIV-1 SIN, una señal de envoltura Psi (Ψ), una cPPT/FLAp, un RRE, un promotor activo en una célula T enlazado de forma operativa a un polinucleótido que codifique un polipéptido de CAR contemplado en la presente y una secuencia de poliadenilación de β -globina de conejo y, opcionalmente, un

WPRE o HPRE.

En diversas modalidades, el vector es un vector viral de integración.

5

En otras diversas modalidades, el vector es un vector viral episomal o sin integración.

En diversas modalidades, los vectores contemplados en la
10 presente comprenden retrovirus de integración o sin integración defectuosos. En una modalidad, un retrovirus o lentivirus «de integración defectuoso» hace referencia a retrovirus o lentivirus con una integrasa que carece de la capacidad de integrar el genoma viral en el genoma de las células
15 hospedadoras. En diversas modalidades, la proteína integrasa se muta para disminuir específicamente su actividad de integrasa. Los vectores lentivirales incompetentes para la integración se obtienen modificando el gen pol que codifica la proteína integrasa, lo cual produce un gen pol mutado que codifica una
20 integrasa de integración deficiente. Estos vectores virales incompetentes para la integración se han descrito en la solicitud de patente WO 2006/010834, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

Las mutaciones ilustrativas en el gen pol de HIV-1 adecuadas para reducir la actividad de integrasa incluyen, de: H12N, H12C, H16C, H16V, S81 R, D41A, K42A, H51A, Q53C, D55V, D64E, D64V, E69A, K71A, E85A, E87A, D116N, D116I, D116A, N120G, 5 N120I, N120E, E152G, E152A, D35E, K156E, K156A, E157A, K159E, K159A, K160A, R166A, D167A, E170A, H171A, K173A, K186Q, K186T, K188T, E198A, R199C, R199T, R199A, D202A, K211A, Q214L, Q216L, Q221 L, W235F, W235E, K236S, K236A, K246A, G247W, D253A, R262A, R263A y K264H.

10

Las mutaciones ilustrativas en el gen pol de HIV-1 adecuadas para reducir la actividad de integrasa incluyen, de: D64E, D64V, E92K, D116N, D116I, D116A, N120G, N120I, N120E, E152G, E152A, D35E, K156E, K156A, E157A, K159E, K159A, W235F y W235E.

15

En una modalidad particular, una integrasa comprende una mutación en uno o más de los aminoácidos D64, D116 o E152. En una modalidad, una integrasa comprende una mutación los aminoácidos D64, D116 y E152. En una modalidad particular, una 20 integrasa de HIV-1 defectuosa comprende una mutación D64V.

Una «célula hospedadora» incluye células electroporadas, transfectadas, infectadas o transducidas *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* con un vector recombinante o un polinucleótido de la

invención. Las células hospedadoras pueden incluir células de envoltura, células productoras y células infectadas con vectores virales. En modalidades particulares, las células hospedadoras infectadas con el vector viral de la invención se
5 administran a un sujeto que necesita terapia. En determinadas modalidades, el término «célula objetivo» se utiliza de forma intercambiable con célula hospedadora y hace referencia a células transfectadas, infectadas o transducidas de un tipo celular deseado. En modalidades preferidas, la célula objetivo
10 es una célula T.

A menudo se necesita producción de partículas virales a gran escala para lograr una titulación viral razonable. Las partículas virales se producen transfectando un vector de
15 transferencia en una línea celular de envoltura que comprenda genes accesorios y/o estructurales virales, p. ej., genes gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpu, vpx o nef u otros genes retroviral.

20 Tal como se utiliza en la presente, el término «vector de envoltura» hace referencia a un vector de expresión o vector viral que carece de una señal de envoltura y comprende un polinucleótido que codifica uno, dos, tres, cuatro o más genes accesorios y/o estructurales virales. Típicamente, los vectores

de envoltura se incluyen en una célula de envoltura y se introducen en la célula mediante transfección, transducción o infección. Los expertos en la técnica conocen métodos de transfección, transducción o infección. Un vector de transferencia retroviral/lentiviral de la presente invención puede introducirse en una línea celular de envoltura mediante transfección, transducción o infección para generar una línea celular o célula productora. Los vectores de envoltura de la presente invención se pueden introducir en líneas celulares o células humanas a través de métodos estándares que incluyen, p. ej., transfección con fosfato cálcico, lipofección o electroporación. En algunas modalidades, los vectores de envoltura se introducen en las células junto con un marcador seleccionable dominante, como neomicina, higromicina, puromicina, blastocidina, zeocina, timidina cinasa, DHFR, Gln sintetasa o ADA, seguido por selección con el fármaco adecuado y aislamiento de clones. Un gen marcador seleccionable se puede enlazar físicamente con genes codificados por el vector de envoltura, p. ej., mediante IRES o péptidos virales de autoescisión.

Las proteínas de envoltura viral (env) determinan el espectro de células hospedadoras que pueden infectarse y transformarse en última instancia mediante retrovirus recombinantes generados

a partir de las líneas celulares. En el caso de lentivirus, como HIV-1, HIV-2, SIV, FIV y EIV, las proteínas env incluyen gp41 y gp120. Preferentemente, las proteínas env virales expresadas mediante células de envoltura de la invención se
5 codifican en un vector separado mediante los genes gag y pol virales, como se describió previamente.

Los ejemplos ilustrativos de genes env de derivación retroviral que se pueden utilizar en la invención incluyen, de modo no
10 taxativo: envolturas MLV, envoltura 10A1, BAEV, FeLV-B, RD114, SSAV, Ébola, Sendai, FPV (virus de plaga aviaria) y envolturas de virus de influenza. De forma similar, se pueden utilizar envolturas de codificación génica de virus del ARN (p. ej., familias de virus del ARN de Picornaviridae, Calciviridae,
15 Astroviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Reoviridae, Birnaviridae, Retroviridae), así como de virus del ADN (familias de Hepadnaviridae, Circoviridae, Parvoviridae, Papovaviridae,
20 Adenoviridae, Herpesviridae, Poxviridae e Iridoviridae). Los ejemplos representativos incluyen FeLV, VEE, HFVW, WDSV, SFV, Rabies, ALV, BIV, BLV, EBV, CAEV, SNV, ChTLV, STLV, MPMV, SMRV, RAV, FuSV, MH2, AEV, AMV, CT10 y EIAV.

En otras modalidades, las proteínas de envoltura para pseudotipar un virus de la presente invención incluyen, de modo no taxativo, cualquiera de los siguientes virus: influenza A, como H1N1, H1N2, H3N2 y H5N1 (gripe aviar), influenza B, virus
5 de influenza C, virus de hepatitis A, virus de hepatitis B, virus de hepatitis C, virus de hepatitis D, virus de hepatitis E, rotavirus, cualquier virus del grupo de virus Norwalk, adenovirus entéricos, parvovirus, virus de fiebre del Dengue, viruela de los monos, mononegavirales, Lyssavirus como virus de
10 la rabia, virus del murciélago de Lagos, virus de Mokola, virus de Duvenhage, virus del murciélago europeo 1 y 2 y virus del murciélago australiano, efemorovirus, vesiculovirus, virus de estomatitis vesicular (VSV), herpesvirus como virus del herpes simple tipos 1 y 2, varicela zoster, citomegalovirus, virus de
15 Epstein-Bar (EBV), herpesvirus humanos (HHV), herpesvirus humanos tipo 6 y 8, virus de inmunodeficiencia humana (HIV), virus de papiloma, gamaherpesvirus murino, arenavirus como virus de fiebre hemorrágica argentina, virus de fiebre hemorrágica boliviana, virus de fiebre hemorrágica asociada con
20 Sabia, virus de fiebre hemorrágica venezolana, virus de fiebre de Lassa, virus de Machupo, virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV, por su sigla en inglés), Bunyaviridae como virus de fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, Hantavirus, fiebre hemorrágica con virus que provoca síndrome renal, virus de

fiebre del valle del Rift, Filoviridae (filovirus), incluida
fiebre hemorrágica del Ébola y fiebre hemorrágica de Marburgo,
Flaviviridae incluido virus de la enfermedad de la selva de
Kaysanur, virus de fiebre hemorrágica de Omsk, virus que
5 provoca encefalitis transmitido por garrapatas y
Paramyxoviridae como virus de Hendra y virus de Nipah, viruela
mayor y viruela menor (viruela), alfavirus como virus de
encefalitis equina de Venezuela, virus de encefalitis equina
oriental, virus de encefalitis equina occidental, coronavirus
10 asociado con SARS (SARS-CoV), por su sigla en inglés), virus
del Nilo occidental, cualquier virus que provoque encefalitis.

En una modalidad, la invención brinda células de envoltura que
producen retrovirus recombinantes, p. ej., lentivirus,
15 pseudotipados con la glicoproteína VSV-G.

Los términos «pseudotipo» y «pseudotipado», tal como se
utilizan en la presente, hacen referencia a un virus cuyas
proteínas de envoltura se sustituyeron con las de otro virus
20 que poseía características preferibles. Por ejemplo, el HIV se
puede pseudotipar con proteínas de envoltura de la proteína G
del virus de estomatitis vesicular (VSV-G, por su sigla en
inglés), lo cual le permite al HIV infectar un mayor espectro
de células, dado que las proteínas de envoltura del HIV

(codificado por el gen env) normalmente dirigen el virus a células que presentan CD4+. En una modalidad preferida de la invención, las proteínas de envoltura lentivirales se pseudotipan con VSV-G. En una modalidad, la invención brinda
5 células de envoltura que producen retrovirus recombinantes, p. ej., lentivirus, pseudotipadas con la glicoproteína de envoltura VSV-G.

Tal como se utiliza en la presente, el término «líneas
10 celulares de envoltura» se utiliza en referencia a líneas celulares que no contienen una señal de envoltura, pero que expresan de forma estable o transitoria proteínas estructurales virales y enzimas de replicación (p. ej., gag, pol y env) necesarias para la envoltura correcta de partículas virales. Se
15 puede utilizar cualquier línea celular adecuada para preparar células de envoltura de la invención. En general, las células son células de mamífero. En una modalidad particular, las células que se utilizan para producir la línea celular de envoltura son células humanas. Las líneas celulares adecuadas
20 que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, células CHO, células BHK, células MDCK, células C3H 10T1/2, células FLY, células Psi-2, células BOSC 23, células PA317, células WEHI, células COS, células BSC 1, células BSC 40, células BMT 10, células VERO, células W138, células MRC5, células A549, células

HT1080, células 293, células 293T, células B-50, células 3T3, células NIH3T3, células HepG2, células Saos-2, células Huh7, células HeLa, células W163, células 211 y células 211A. En modalidades preferidas, las células de envoltura son células 5 293, células 293T o células A549. En otra modalidad preferida, las células son células A549.

Tal como se utiliza en la presente, el término «línea celular productora» hace referencia a una línea celular que puede 10 producir partículas retrovirales recombinantes, que comprende una línea celular de envoltura y una construcción de vector de transferencia que comprende una señal de envoltura. La producción de partículas virales infecciosas y soluciones madre virales puede realizarse utilizando técnicas convencionales. En 15 la técnica se conocen métodos para preparar soluciones madre virales y estos se ilustran, p. ej., en Y. Soneoka *et ál.* (1995) *Nucl. Acids Res.* 23:628-633 y N. R. Landau *et ál.* (1992) *J. Virol.* 66:5110-5113. Las partículas de virus infecciosas se pueden recoger de las células de envoltura utilizando técnicas 20 convencionales. Por ejemplo, las partículas infecciosas se pueden recoger mediante lisis celular o recolección del sobrenadante del cultivo celular, como se conoce en la técnica. Opcionalmente, las partículas de virus recolectadas se pueden purificar si se desea. Los expertos en la técnica conocen las

técnicas de purificación adecuadas.

El suministro de uno o más genes u otras secuencias de polinucleótidos con un vector retroviral o lentiviral mediante
5 infección viral en lugar de transfección se indica como una «transducción». En una modalidad, los vectores retrovirales se transducen en una célula mediante infección e integración del provirus. En determinadas modalidades, una célula objetivo, p. ej., una célula T, se «transduce» si esta comprende un gen u
10 otra secuencia de polinucleótidos que se suministra a la célula mediante infección utilizando un vector viral o retroviral. En modalidades particulares, una célula transducida comprende uno o más genes u otras secuencias de polinucleótidos que se suministran mediante un vector retroviral o lentiviral en su
15 genoma celular.

En modalidades particulares, las células hospedadoras transducidas con el vector viral de la invención que expresa uno o más polipéptidos se administran a un sujeto para tratar
20 y/o prevenir una neoplasia de células B. Otros métodos relacionados con el uso de vectores virales en terapia génica, que se pueden utilizar de acuerdo con determinadas modalidades de la presente invención, se pueden encontrar, p. ej., en Kay, M. A. (1997) *Chest* 111(6 Supp.):138S-142S; Ferry, N. y Heard,

J. M. (1998) *Hum. Gene Ther.* 9:1975-81; Shiratory, Y. et ál. (1999) *Liver* 19:265-74; Oka, K. et ál. (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11:179-86; Thule, P. M. y Liu, J. M. (2000) *Gene Ther.* 7:1744-52; Yang, N. S. (1992) *Crit. Rev. Biotechnol.* 12:335-56;

5 Alt, M. (1995) *J. Hepatol.* 23:746-58; Brody, S. L. y Crystal, R. G. (1994) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 716:90-101; Strayer, D. S. (1999) *Expert Opin. Investig. Drugs* 8:2159-2172; Smith-Arica, J. R. y Bartlett, J. S. (2001) *Curr. Cardiol. Rep.* 3:43-49 y Lee, H. C. et ál. (2000) *Nature* 408:483-8.

10

G. CÉLULAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS

La presente invención contempla, en modalidades particulares, células genéticamente modificadas para expresar los CAR contemplados en la presente para uso en el tratamiento de

15 afecciones relacionadas con células B. Tal como se utiliza en la presente, el término «genéticamente alteradas» o «genéticamente modificadas» hace referencia a la adición de material genético adicional en forma de ADN o ARN en el material genético total en una célula. Los términos «células

20 genéticamente modificadas», «células modificadas» y «células redirigidas» se utilizan de forma intercambiable. Tal como se utiliza en la presente, el término «terapia génica» hace referencia a la introducción de material genético adicional en forma de ADN o ARN en el material genético total en una célula

que restaura, corrige o modifica la expresión de un gen o con el fin de expresar un polipéptido terapéutico, p. ej., un CAR.

En modalidades particulares, los CAR contemplados en la presente se introducen y expresan en células efectoras inmunes para redirigir su especificidad hacia un antígeno objetivo de interés, p. ej., un polipéptido de BCMA. Una «célula efectora inmune» es cualquier célula del sistema inmunológico con una o más funciones efectoras (p. ej., actividad de destrucción de células citotóxicas, secreción de citocinas, inducción de ADCC y/o CDC).

Las células efectoras inmunes de la invención pueden ser autólogas/autogénicas («propias») o no autólogas («no propias», p. ej., alogénicas, singénicas o xenogénicas).

«Autólogo/a», tal como se utiliza en la presente, hace referencia a células del mismo sujeto.

«Alogénico/a», tal como se utiliza en la presente, hace referencia a células de la misma especie que difieren genéticamente con respecto a la célula en comparación.

«Singénico/a», tal como se utiliza en la presente, hace

referencia a células de un sujeto diferente que son genéticamente idénticas a la célula en comparación.

«Xenogénico/a», tal como se utiliza en la presente, hace
5 referencia a células de especies diferentes con respecto a la célula en comparación. En modalidades preferidas, las células de la invención son alogénicas.

Las células efectoras inmunes ilustrativas que se utilizan con
10 los CAR contemplados en la presente incluyen linfocitos T. Los términos «célula T» o «linfocito T» se reconocen en la técnica y pretenden incluir timocitos, linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros, linfocitos T en reposo o linfocitos T activados. Una célula T puede ser una célula T auxiliar (Th,
15 por su sigla en inglés), por ejemplo, una célula T auxiliar 1 (Th1) o T auxiliar 2 (Th2). La célula T puede ser una célula T auxiliar HTL, célula T CD4⁺) célula T CD4⁺, una célula T citotóxica (CTL, célula T CD8⁺), célula T CD4⁺CD8⁺, célula T CD4⁻CD8⁻ o cualquier otro subconjunto de células T. Otras
20 poblaciones ilustrativas de células T adecuadas para uso en modalidades particulares incluyen células T sin tratamiento y células T de memoria.

Como observará el experto en la técnica, también se pueden

utilizar otras células como células efectoras inmunes con los CAR descritos en la presente. En particular, las células efectoras inmunes también incluyen células NK, células NKT, neutrófilos y macrófagos. Las células efectoras inmunes también

5 incluyen progenitores de células efectoras en los que se puede diferenciar dichas células progenitoras en una célula efectora inmune *in vivo* o *in vitro*. Por lo tanto, en modalidades particulares, la célula efectora inmune incluye progenitores de células efectoras inmunes como células madre hematopoyéticas

10 (HSC, por su sigla en inglés) contenidas en la población CD34+ de células derivada de sangre de cordón umbilical, médula ósea o sangre periférica movilizada que, luego de administrarse a un sujeto, se diferencian en células efectoras inmunes maduras o cuya diferenciación en células efectoras inmunes maduras se

15 puede inducir *in vitro*.

Tal como se utiliza en la presente, las células efectoras inmunes genéticamente modificadas para incluir CAR específico del BCMA se pueden indicar como «células efectoras inmunes

20 redirigidas específicas del BCMA».

El término «célula CD34+», tal como se utiliza en la presente, hace referencia a una célula que expresa la proteína CD34 en su superficie celular. «CD34», tal como se utiliza en la presente,

hace referencia a una glicoproteína de superficie celular (p. ej., proteína sialomucina) que a menudo actúa como factor de adhesión entre células y que se encuentra implicada en el ingreso de la célula T en los nódulos linfáticos. La población
5 de células CD34+ contiene células madre hematopoyéticas (HSC) que, luego de administrarse a un paciente, se diferencian y contribuyen a todos los linajes hematopoyéticos, incluidas células T, células NK, células NKT, neutrófilos y células del linaje de monocitos/macrófagos.

10

La presente invención brinda métodos para realizar las células efectoras inmunes que expresan el CAR contemplado en la presente. En una modalidad, el método comprende transfectar o transducir células efectoras inmunes aisladas de un individuo,
15 de modo que las células efectoras inmunes expresen uno o más CAR, como se describe en la presente. En determinadas modalidades, las células efectoras inmunes se aíslan de un individuo y se modifican genéticamente sin manipulación adicional in vitro. Estas células luego pueden volver a
20 administrarse directamente al individuo. En otras modalidades, las células efectoras inmunes primero se activan y estimulan para proliferarse in vitro antes de modificarse genéticamente para expresar un CAR. En este sentido, las células efectoras inmunes pueden cultivarse antes y/o después de modificarse

genéticamente (es decir, transducirse o transfectarse para expresar un CAR contemplado en la presente).

En modalidades particulares, antes de la manipulación *in vitro*
5 o la modificación genética de las células efectoras inmunes descritas en la presente, la fuente de las células se obtiene de un sujeto. En modalidades particulares, las células efectoras inmunes modificadas por CAR comprenden células T. Se pueden obtener células T de diversas fuentes que incluyen, de
10 modo no taxativo, células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre de cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un lugar de infección, ascitis, efusión pleural, tejido del bazo y tumores. En determinadas modalidades, las células T se pueden obtener de
15 una unidad de sangre extraída de un sujeto utilizando cualquier cantidad de técnicas conocidas por el experto en la técnica, como sedimentación, p. ej., separación FICOLL™. En una modalidad, se obtienen células de la sangre en circulación de un individuo mediante aféresis. El producto de la aféresis
20 típicamente contiene linfocitos, incluidas células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En una modalidad, las células extraídas mediante aféresis se pueden lavar para retirar la fracción de plasma y colocar las células en un

amortiguador o medio adecuado para el procesamiento adicional. Las células se pueden lavar con PBS o con otra solución adecuada que carezca de calcio, magnesio y la mayoría, si no la totalidad, de cualquier otro catión divalente. Como observarán
5 los expertos en la técnica, una etapa de lavado puede estar acompañada por métodos conocidos por los expertos en la técnica, como uso de una centrífuga de flujo continuo semiautomática. Por ejemplo, el procesador celular Cobe 2991, el CytoMate de Baxter o similar. Luego del lavado, las células
10 se pueden volver a suspender en diversos amortiguadores biocompatibles u otra solución salina con o sin amortiguador. En determinadas modalidades, los componentes no deseados de la muestra de aféresis pueden retirarse en medio de cultivo resuspendido directamente en la célula.

15

En determinadas modalidades, las células T se aíslan de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por su sigla en inglés) mediante lisado de los glóbulos rojos y agotamiento de los monocitos, por ejemplo, con centrifugado a través de un
20 gradiente de PERCOLL™. También se puede aislar una subpoblación específica de células T con expresión de uno o más de los siguientes marcadores: CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA y CD45RO, mediante técnicas de selección positiva o negativa. En una modalidad, una subpoblación específica de células T con

expresión de CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA y CD45RO se aísla adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. Por ejemplo, el enriquecimiento de una población de células T mediante selección negativa se puede lograr con una
5 combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores superficiales exclusivos de las células seleccionadas de forma negativa. Un método para uso en la presente es clasificación celular y/o selección mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza un cóctel de anticuerpos
10 monoclonales dirigidos a marcadores superficiales celulares presentes en las células seleccionadas de forma negativa. Por ejemplo, para enriquecimiento de células CD4⁺ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales típicamente incluye anticuerpos de CD14, CD20, CD11b, CD16,
15 HLA-DR y CD8. También se pueden utilizar citometría de flujo y clasificación celular para aislar poblaciones celulares de interés para uso en la presente invención.

Las PMBC se pueden modificar genéticamente de forma directa
20 para expresar CAR, utilizando métodos contemplados en la presente. En determinadas modalidades, luego de aislar las PBMC, los linfocitos T se aíslan adicionalmente y, en determinadas modalidades, tanto los linfocitos T citotóxicos como auxiliares se pueden clasificar en subpoblaciones de

células T sin tratamiento, de memoria y efectoras, antes o después de la modificación genética y/o la expansión.

Las células CD8⁺ se pueden obtener utilizando métodos
5 estándares. En algunas modalidades, las células CD8⁺ se clasifican adicionalmente en células sin tratamiento, de memoria centrales y efectoras, identificando antígenos de la superficie celular asociados con cada uno de dichos tipos de células CD8⁺.

10

En determinadas modalidades, los linfocitos T de CD8⁺ sin tratamiento se caracterizan mediante expresión de marcadores fenotípicos de células T sin tratamiento que incluyen CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD 127 y CD45RA.

15

En modalidades particulares, las células T de memoria se encuentran presentes tanto en subconjuntos CD62L⁺ como CD62L⁻ de linfocitos de sangre periférica CD8⁺. Las PBMC se clasifican en fracciones CD62L⁻CD8⁺ y CD62L⁺CD8⁺ luego de la tinción con
20 anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L. En algunas modalidades, la expresión de marcadores fenotípicos de células T de memoria centrales incluyen CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 y CD127 y son negativas para granzima B. En algunas modalidades, las células T de memoria centrales son células T CD45RO⁺, CD62L⁺, CD8⁺.

En algunas modalidades, las células T efectoras son negativas para CD62L, CCR7, CD28 y CD127 y positivas para granzima B y perforina.

5

En determinadas modalidades, las células T CD4⁺ se clasifican adicionalmente en subpoblaciones. Por ejemplo, las células auxiliares CD4⁺ se pueden clasificar en células sin tratamiento, de memoria centrales y efectoras, identificando
10 las poblaciones celulares con antígenos de superficie celular. Los linfocitos CD4⁺ se pueden obtener utilizando métodos estándares. En algunas modalidades, los linfocitos T CD4⁺ sin tratamiento son células T CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺ CD4⁺. En algunas modalidades, las células CD4⁺ de memoria centrales son
15 positivas para CD62L y CD45RO. En algunas modalidades, las células CD4⁺ efectoras son negativas para CD62L y CD45RO.

Las células efectoras inmunes, como las células T, se pueden modificar genéticamente luego de aislamiento con métodos
20 estándares o las células efectoras inmunes se pueden activar y expandir (o diferenciarse en el caso de progenitores) *in vitro* antes de modificarse genéticamente. En una modalidad particular, las células efectoras inmunes, como las células T, se modifican genéticamente con los receptores de antígenos

quiméricos contemplados en la presente (p. ej., se transducen con un vector viral que comprende un ácido nucleico que codifica un CAR) y luego se activan y expanden *in vitro*. En diversas modalidades, las células T se pueden activar y expandirse antes o después de la modificación genética para expresar un CAR, utilizando métodos descritos, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.º 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681 ; 7, 144,575; 7,067,318; 7, 172,869; 7,232,566; 7, 175,843; 10 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041 y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20060121005.

En términos generales, las células T se expanden mediante contacto con una superficie con un agente unido que estimule una señal asociada con el complejo de TCR CD3 y un ligando que estimule una molécula coestimuladora en la superficie de las células T. Las poblaciones de células T se pueden estimular mediante contacto con un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno de este o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, así como mediante contacto con un activador de proteína cinasa C (p. ej., briostatina) en conjunto con un ionóforo cálcico. La estimulación conjunta de moléculas accesorias en la superficie de células T también se encuentra contemplada.

En modalidades particulares, las PBMC o células T aisladas entran en contacto con un agente estimulador y agentes coestimuladores, como anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, generalmente unidos a una microesfera u otra superficie, en un medio de cultivo con citocinas adecuadas, como IL-2, IL-7 y/o IL-15. Para estimular la proliferación de células T CD4⁺ o células T CD8⁺, un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Se pueden utilizar ejemplos de anticuerpo anti-CD28 que incluyen 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diacione, Besancon, Francia), así como otros métodos comúnmente conocidos en la técnica (Berg et ál., *Transplant Proc.* 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et ál., *J. Exp. Med.* 190(9): 13191328, 1999; Garland et ál., *J. Immunol Meth.* 227(1 -2):53-63, 1999). Los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a la misma microesfera sirven como célula que presenta el antígeno (APC, por su sigla en inglés) «sustituta». En otras modalidades, las células T se pueden activar y estimular para proliferarse con células de alimentación y anticuerpos y citocinas adecuados, utilizando métodos como los descritos en US6040177; US5827642 y WO2012129514.

En otras modalidades, las APC artificiales (aAPC) se realizan mediante modificación de células K562, U937, 721.221, T2 y C1R para dirigir la expresión y secreción estables de diversas

citocinas y moléculas coestimuladoras. En una modalidad particular, se utilizan aAPC K32 o U32 para dirigir la expresión de una o más moléculas estimuladoras basadas en anticuerpo en la superficie de células AAPC. La expresión de

5 diversas combinaciones de genes en la aAPC permite la determinación exacta de los requisitos de activación de células T humanas, de modo de poder adaptar las aAPC para propagación óptima de subconjuntos de células T con requisitos de crecimiento específicos y funciones distintas. Las aAPC apoyan

10 el crecimiento ex vivo y la expansión a largo plazo de células T CD8 humanas funcionales sin requerir la adición de citoxinas exógenas, a diferencia del uso de APC naturales. Las poblaciones de células T se pueden expandir mediante aAPC que expresan diversas moléculas coestimuladoras y que incluyen, de

15 modo no taxativo, CD137L (4-1BBL), CD134L (OX40L) y/o CD80 o CD86. Por último, las APC brindan una plataforma eficaz para expandir células T genéticamente modificadas y mantener la expresión de CD28 en células T CD8. Las aAPC que se brindan en WO 03/057171 y US2003/0147869 se incorporan en la presente en

20 su totalidad mediante esta referencia.

En una modalidad, las células CD34⁺ se transducen con una construcción de ácido nucleico, de acuerdo con la invención. En determinadas modalidades, las células CD34⁺ transducidas se

diferencian en células efectoras inmunes maduras *in vivo* luego de la administración a un sujeto, generalmente el sujeto a partir del cual se aislaron las células originalmente. En otra modalidad, las células CD34⁺ se pueden estimular *in vitro* antes
5 de la exposición o después de la modificación genética con un CAR como se describe en la presente, con una o más de las siguientes citocinas: ligando de Flt-3 (FLT3), factor de célula madre (SCF, por su sigla en inglés), factor de crecimiento y diferenciación de megacariocitos (TPO), IL-3 e IL-6, de acuerdo
10 con métodos descritos previamente (Asheuer *et ál.*, 2004; Imren, *et ál.*, 2004).

La invención brinda una población de células efectoras inmunes modificadas para el tratamiento de cáncer, en la que las
15 células efectoras inmunes comprenden un CAR como se describe en la presente. Por ejemplo, se elabora una población de células efectoras inmunes modificadas a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de un paciente diagnosticado con neoplasia de células B como se describe en la
20 presente (donantes autólogos). Las PBMC forman una población heterogénea de linfocitos T que pueden ser CD4⁺, CD8⁺ o CD4⁺ y CD8⁺.

Las PBMC también pueden incluir otros linfocitos citotóxicos

como células NK o células NKT. Se puede introducir un vector de expresión con la secuencia de codificación de un CAR contemplado en la presente en una población de células T donantes humanas, células NK o células NKT. Las células T transducidas de forma exitosa que conllevan el vector de expresión se pueden clasificar utilizando citometría de flujo para aislar células T positivas para CD3 y luego propagarse adicionalmente para aumentar la cantidad de estas células T con expresión de proteína CAR además de activación celular con anticuerpos anti-CD3 y/o anticuerpos anti-CD28 e IL-2 o cualquier otro método conocido en la técnica, como se describe en otro punto en la presente. Se utilizan procedimientos estándares para crioconservación de células T con expresión de células T de proteínas CAR para almacenamiento y/o preparación para uso en un sujeto humano. En una modalidad, la transducción, el cultivo y/o la expansión in vitro de células T se realizan sin productos derivados de animales no humanos, como suero fetal bovino y suero bovino fetal. Dado que se modifica genéticamente una población heterogénea de PBMC, las células transducidas resultantes son una población heterogénea de células modificadas que comprende un BCMA dirigido a CAR como se contempla en la presente.

En otra modalidad, se puede utilizar una mezcla de, p. ej.,

uno, dos, tres, cuatro, cinco o más vectores de expresión diferentes en la modificación genética de una población donante de células efectoras inmunes, en la que cada vector codifica una proteína de receptor de antígeno quimérico diferente, como

5 se contempla en la presente. Las células efectoras inmunes modificadas resultantes forman una población mixta de células modificadas, en la que una proporción de las células modificadas expresa más de una proteína CAR diferente.

10 En una modalidad, la invención brinda un método para almacenar células efectoras inmunes con expresión de proteína CAR murinas, humanas o humanizadas y genéticamente modificadas que se dirigen a una proteína del BCMA, que comprende crioconservar las células efectoras inmunes de modo que las células

15 permanezcan viables luego del descongelado. Una fracción de las células efectoras inmunes que expresan las proteínas CAR se pueden crioconservar con métodos conocidos en la técnica para brindar una fuente permanente de dichas células para tratamiento futuro de pacientes que padezcan la afección

20 relacionada con células B. De necesitarse, las células efectoras inmunes transformadas y crioconservadas se pueden descongelar, cultivarse y expandirse para más células de este tipo.

Tal como se utiliza en la presente, «crioconservación» hace referencia a la conservación de células mediante enfriamiento hasta temperaturas por debajo de cero, como (típicamente) 77 K o -196 °C (el punto de ebullición del nitrógeno líquido). Los
5 agentes de crioconservación se utilizan a menudo a temperaturas por debajo de cero para evitar que las células conservadas se dañen debido a congelamiento a bajas temperaturas o calentamiento hasta temperatura ambiente. Los agentes de crioconservación y las velocidades de enfriamiento óptimas
10 pueden brindar protección contra la lesión celular. Los agentes de crioconservación que se pueden utilizar incluyen, de modo no taxativo, sulfóxido de dimetilo (DMSO) (Lovelock y Bishop, Nature, 1959; 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, Nature, 1961; 190: 1204-1205), glicerol, polivinilpirrolidina (Rinfret, Ann. N.Y.
15 Acad. Sci., 1960; 85: 576) y polietilenglicol (Sloviter y Ravdin, Nature, 1962; 196: 48). La velocidad de enfriamiento preferida es 1 °C a 3 °C/minuto. Luego de al menos dos horas, las células T alcanzaron una temperatura de -80 °C y se pueden colocar directamente en nitrógeno líquido (-196 °C) para
20 almacenamiento permanente, como en un recipiente de almacenamiento criogénico a largo plazo.

H. MÉTODOS DE ELABORACIÓN DE CÉLULAS T

Las células T elaboradas con los métodos contemplados en la

presente brindan mejores composiciones para inmunoterapia adoptiva. Sin deseo de limitarse a ninguna teoría particular, se cree que las composiciones de células T elaboradas con los métodos contemplados en la presente se encuentran imbuidas con

5 propiedades superiores, incluida una mayor supervivencia, expansión en ausencia relativa de diferenciación y persistencia *in vivo*. En una modalidad, un método para elaborar células T comprende poner en contacto las células con uno o más agentes que modulen una vía de señalización de células PI3K. En una

10 modalidad, un método para elaborar células T comprende poner en contacto las células con uno o más agentes que modulen una vía de señalización de células PI3K/Akt/mTOR. En diversas modalidades, las células T se pueden obtener de cualquier fuente y ponerse en contacto con el agente durante las fases de

15 activación y/o expansión del proceso de elaboración. Las composiciones de células T resultantes se enriquecen en células T potentes en su desarrollo con la capacidad de proliferarse y expresar uno o más de los siguientes biomarcadores: CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197 y CD38. En una modalidad,

20 las poblaciones de células con células T tratadas con uno o más inhibidores de PI3K se enriquecen para una población de células T CD8+ con expresión conjunta de uno o más o todos los siguientes biomarcadores: CD62L, CD127, CD197 y CD38.

En una modalidad, se elaboran células T modificadas que comprenden niveles mantenidos de proliferación y menor diferenciación. En una modalidad particular, las células T se elaboran mediante estimulación de células T para activarse y proliferarse en presencia de una o más señales estimuladoras y un agente que es un inhibidor de una vía de señalización celular PI3K.

Las células T luego se pueden modificar para expresar un CAR anti-BCMA. En una modalidad, las células T se modifican mediante transducción de las células T con un vector viral que comprende un CAR anti-BCMA contemplado en la presente. En una modalidad específica, las células T se modifican antes de la estimulación y activación en presencia de un inhibidor de una vía de señalización celular de PI3K. En otra modalidad específica, las células T se modifican después de la estimulación y activación en presencia de un inhibidor de una vía de señalización celular de PI3K. En una modalidad particular, las células T se modifican dentro de las 12 horas, 24 horas, 36 horas o 48 horas de la estimulación y activación en presencia de un inhibidor de una vía de señalización celular de PI3K.

Luego de activar las células T, las células se cultivan para

proliferarse. Las células T se pueden cultivar durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, al menos 2 semanas, al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses o más con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más rondas de expansión.

5

En diversas modalidades, las composiciones de células T se elaboran en presencia de uno o más inhibidores de la vía de PI3K. Los inhibidores pueden dirigirse a una o más actividades en la vía o a una única actividad. Sin deseo de limitarse a
10 ninguna teoría particular, se contempla que el tratamiento o contacto de las células T con uno o más inhibidores de la vía de PI3K durante las fases de estimulación, activación y/o expansión del proceso de elaboración aumenta preferentemente las células T jóvenes, con lo cual se producen composiciones de
15 células T terapéuticas superiores.

En una modalidad particular, se brinda un método para aumentar la proliferación de células T que expresan un receptor de células T modificado. Estos métodos pueden comprender, por
20 ejemplo, extracción de una fuente de células T de un sujeto, estimulación y activación de las células T en presencia de uno o más inhibidores de la vía PI3K, modificación de las células T para expresar un CAR anti-BCMA, p. ej., CAR anti-BCMA02 y expansión de las células T en cultivo.

En una modalidad determinada, un método para producir poblaciones de células T enriquecidas para expresión de uno o más de los siguientes marcadores: CD62L, CCR7, CD28, CD27, 5 CD122, CD127, CD197 y CD38. En una modalidad, las células T jóvenes comprenden uno o más o todos los siguientes marcadores biológicos: CD62L, CD127, CD197 y CD38. En una modalidad, se brindan células T jóvenes que carecen de expresión de CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 y LAG3. Tal como se indicó en 10 otro punto en la presente, los niveles de expresión de biomarcadores de células T jóvenes es relativo a los niveles de expresión de dichos marcadores en poblaciones de células efectoras inmunes o células T más diferenciadas.

15 En una modalidad, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se utilizan como fuente de células T en los métodos de elaboración de células T contemplados en la presente. Las PBMC forman una población heterogénea de linfocitos T que pueden ser CD4⁺, CD8⁺ o CD4⁺ y CD8⁺ y pueden 20 incluir otras células mononucleares como monocitos, células B, células NK y células NKT. Se puede introducir un vector de expresión con un polinucleótido que codifica un CAR o TCR modificado contemplado en la presente en una población de células T donantes humanas, células NK o células NKT. Las

células T transducidas de forma exitosa que conllevan el vector de expresión se pueden clasificar utilizando citometría de flujo para aislar células T positivas para CD3 y luego propagarse adicionalmente para aumentar la cantidad de células

5 T modificadas además de activación celular con anticuerpos anti-CD3 y/o anticuerpos anti-CD28 e IL-2, IL-7 y/o IL-15 o cualquier otro método conocido en la técnica, como se describe en otro punto en la presente.

10 Los métodos de elaboración contemplados en la presente pueden comprender además crioconservación de células T modificadas para almacenamiento y/o preparación para uso en un sujeto humano. Las células T se crioconservan para que las células permanezcan viables luego de descongelarse. De necesitarse, las

15 células efectoras inmunes transformadas y crioconservadas se pueden descongelar, cultivarse y expandirse para más células de este tipo. Tal como se utiliza en la presente, «crioconservación» hace referencia a la conservación de células mediante enfriamiento hasta temperaturas por debajo de cero,

20 como (típicamente) 77 K o -196 °C (el punto de ebullición del nitrógeno líquido). Los agentes de crioconservación se utilizan a menudo a temperaturas por debajo de cero para evitar que las células conservadas se dañen debido a congelamiento a bajas temperaturas o calentamiento hasta temperatura ambiente. Los

agentes de crioconservación y las velocidades de enfriamiento óptimas pueden brindar protección contra la lesión celular. Los agentes de crioconservación que se pueden utilizar incluyen, de modo no taxativo, sulfóxido de dimetilo (DMSO) (Lovelock y Bishop, *Nature*, 1959; 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, *Nature*, 1961; 190: 1204-1205), glicerol, polivinilpirrolidina (Rinfret, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1960; 85: 576) y polietilen glicol (Sloviter y Ravdin, *Nature*, 1962; 196: 48). La velocidad de enfriamiento preferida es 1 °C a 3 °C/minuto. Luego de al menos dos horas, las células T alcanzaron una temperatura de -80 °C y se pueden colocar directamente en nitrógeno líquido (-196 °C) para almacenamiento permanente, como en un recipiente de almacenamiento criogénico a largo plazo.

15 **1. CÉLULAS T**

La presente invención contempla la elaboración de composiciones mejoradas de células T de CAR. Las células T que se utilizan para producción de células T CAR pueden ser autólogas/autogénicas («propias») o no autólogas («no propias», p. ej., alogénicas, singénicas o xenogénicas). En modalidades preferidas, las células T se obtienen de un sujeto mamífero. En una modalidad más preferida, las células T se obtienen de un sujeto primate. En la modalidad más preferida, las células T se obtienen de un sujeto humano.

Se pueden obtener células T de diversas fuentes que incluyen, de modo no taxativo, células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre
5 de cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un lugar de infección, ascitis, efusión pleural, tejido del bazo y tumores. En determinadas modalidades, las células T se pueden obtener de una unidad de sangre extraída de un sujeto utilizando cualquier cantidad de técnicas conocidas por el experto en la técnica,
10 como sedimentación, p. ej., separación FICOLL™. En una modalidad, se obtienen células de la sangre en circulación de un individuo mediante aféresis. El producto de la aféresis típicamente contiene linfocitos, incluidas células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos
15 nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En una modalidad, las células extraídas mediante aféresis se pueden lavar para retirar la fracción de plasma y colocar las células en un amortiguador o medio adecuado para el procesamiento adicional. Las células se pueden lavar con PBS o con otra solución
20 adecuada que carezca de calcio, magnesio y la mayoría, si no la totalidad, de cualquier otro catión divalente. Como observarán los expertos en la técnica, una etapa de lavado puede estar acompañada por métodos conocidos por los expertos en la técnica, como uso de una centrífuga de flujo continuo

semiautomática. Por ejemplo, el procesador celular Cobe 2991, el CytoMate de Baxter o similar. Luego del lavado, las células se pueden volver a suspender en diversos amortiguadores biocompatibles u otra solución salina con o sin amortiguador.

- 5 En determinadas modalidades, los componentes no deseados de la muestra de aféresis pueden retirarse en medio de cultivo resuspendido directamente en la célula.

En modalidades particulares, en los métodos de elaboración
10 contemplados en la presente se utiliza una población de células con células T, p. ej., PBMC. En otras modalidades, en los métodos de elaboración contemplados en la presente se utiliza una población aislada o purificada de células T. Las células se pueden aislar de células mononucleares de sangre periférica
15 (PBMC) mediante lisado de los glóbulos rojos y agotamiento de los monocitos, por ejemplo, con centrifugado a través de un gradiente de PERCOLL™. En algunas modalidades, luego de aislar las PBMC, tanto los linfocitos T citotóxicos como auxiliares se pueden clasificar en subpoblaciones de células T sin
20 tratamiento, de memoria y efectoras, antes o después de la activación, expansión y/o modificación genética.

También se puede aislar una subpoblación específica de células T con expresión de uno o más de los siguientes marcadores: CD3,

CD4, CD8, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62, CD127 y HLA-DR se pueden aislar adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. En una modalidad, una subpoblación específica de células T que expresa uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en i) CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197 o ii) CD38 o CD62L, CD127, CD197 y CD38 se aísla adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. En diversas modalidades, las composiciones de células T elaboradas no expresan o no expresan de forma sustancial uno o más de los siguientes marcadores: CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 y LAG3.

En una modalidad, la expresión de uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD62L, CD127, CD197 y CD38 aumenta al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces o más en comparación con una población de células T activadas y expandidas sin un inhibidor de PI3K.

20

En una modalidad, la expresión de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 y LAG3 disminuye al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al

menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces o más en comparación con una población de células T activadas y expandidas con un inhibidor de PI3K.

5

En una modalidad, los métodos de fabricación contemplados en la presente aumentan la cantidad de células T de CAR que comprenden uno o más marcadores de células T sin tratamiento o potentes en su desarrollo. Sin deseo de limitarse a ninguna

10 teoría particular, los inventores de la presente creen que el tratamiento de una población de células que comprende células T con uno o más inhibidores de PI3K produce un aumento una expansión de células T potentes en su desarrollo y brinda una inmunoterapia con células T de CAR adoptiva más fuerte y eficaz

15 en comparación con las terapias con células T de CAR existentes.

Los ejemplos ilustrativos de marcadores de células T sin tratamiento o potentes en su desarrollo que aumentaron en

20 células T elaboradas utilizando los métodos contemplados en la presente incluyen, de modo no taxativo, CD62L, CD127, CD197 y CD38. En modalidades particulares, las células T sin tratamiento no expresan o no expresan de forma sustancial uno o más de los siguientes marcadores: CD57, CD244, CD160, PD-1,

BTLA, CD45RA, CTLA4, TIM3 y LAG3.

Con respecto a las células T, las poblaciones de células T que resultan de las diversas metodologías de expansión contempladas en la presente pueden tener diversas propiedades fenotípicas específicas, dependiendo de las condiciones utilizadas. En diversas modalidades, las poblaciones de células T expandidas comprenden uno o más de los siguientes marcadores fenotípicos: CD62L, CD127, CD197, CD38 y HLA-DR.

10

En una modalidad, estos marcadores fenotípicos incluyen mayor expresión de uno o más o todos de CD62L, CD127, CD197 y CD38. En modalidades particulares, se expanden los linfocitos T de CD8⁺ caracterizados mediante expresión de marcadores fenotípicos de células T sin tratamiento que incluyen CD62L, CD127, CD197 y CD38.

15

En modalidades particulares, se expanden las células T caracterizadas mediante expresión de marcadores fenotípicos de células T de memoria central que incluyen CD45RO, CD62L, CD127, CD197 y CD38 y negativos para granzima B. En algunas modalidades, las células T de memoria central son células T CD45RO⁺, CD62L⁺, CD8⁺.

20

En determinadas modalidades, se expanden los linfocitos T de CD4⁺ caracterizados mediante expresión de marcadores fenotípicos de células CD4⁺ sin tratamiento que incluyen CD62L y negativos para la expresión de CD45RA y/o CD45RO. En algunas
5 modalidades, las células CD4⁺ caracterizadas por la expresión de marcadores fenotípicos de células CD4⁺ de memoria central, incluidas positivas para CD62L y CD45RO. En algunas modalidades, las células CD4⁺ efectoras son positivas para CD62L y negativas para CD45RO.

10

En determinadas modalidades, las células T se aíslan de un individuo y se activan y estimulan para proliferarse *in vitro* antes de modificarse genéticamente para expresar un CAR anti-BCMA. En este sentido, las células T pueden cultivarse antes
15 y/o después de modificarse genéticamente (es decir, transducirse o transfectarse para expresar un CAR anti-BCMA contemplado en la presente).

2. ACTIVACIÓN Y EXPANSIÓN

20 Para lograr dosis terapéuticas suficientes de composiciones de células T, las células T a menudo se someten a una o más rondas de estimulación, activación y/o expansión. Las células T se pueden activar y expandir generalmente utilizando métodos descritos, por ejemplo, en las patentes estadounidenses

6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358;
6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869;
7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514 y
6,867,041, cada una de las cuales se incorpora a la presente en
5 su totalidad mediante esta referencia. Las células T
modificadas para expresar un CAR anti-BCMA se pueden activar y
expandir antes y/o después de modificar las células T.
Asimismo, las células T se pueden poner en contacto con uno o
más agentes que modulen la vía de señalización celular de PI3K
10 antes, durante y/o después de la activación y/o expansión. En
una modalidad, las células T fabricadas con los métodos
contemplados en la presente experimentan una, dos, tres, cuatro
o cinco o más rondas de activación y expansión, cada una de las
cuales puede incluir uno o más agentes que modulan la vía de
15 señalización celular de PI3K.

En una modalidad, se presenta un ligando coestimulador en una
célula que presenta antígeno (p. ej., una aAPC, célula
dendrítica, célula B y similares) que se une de forma
20 específica a una molécula coestimuladora cognada en una célula
T, con lo cual se brinda una señal que, además de la señal
principal que brinda, por ejemplo, la unión de un complejo
TCR/CD3, media una respuesta deseada a la célula T. Los
ligandos coestimuladores adecuados incluyen, de modo no

taxativo, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L 1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulador inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM, por su sigla en inglés), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor beta de linfotoxina, ILT3, ILT4, un agonista o anticuerpo que se une al receptor del ligando Toll y un ligando que se une de forma específica con B7-H3.

En una modalidad particular, un ligando coestimulador comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une de forma específica a una molécula coestimuladora presente en una célula T que incluye, de modo no taxativo, CD27, CD28, 4- IBB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado con la función del linfocito (LFA-1, por su sigla en inglés), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une de forma específica con CD83.

Los ligandos coestimuladores adecuados incluyen además antígenos objetivo, que pueden brindarse en forma soluble o expresarse en APC o aAPC que se unen a CAR o TCR modificados que se expresan en células T modificadas.

En diversas modalidades, un método para elaborar células T contemplado en la presente comprende activar una población de

células con células T y expandir la población de células T. La activación de células T se puede lograr brindando una señal de estimulación primaria a través del complejo de TCR/CD3 de la célula T o mediante estimulación de la proteína de superficie CD2 y brindando una señal coestimuladora secundaria a través de una molécula accesoria, p. ej., CD28.

El complejo de TCR/CD3 puede estimularse mediante contacto de la célula T con un agente de unión de CD3 adecuado, p. ej., un ligando de CD3 o un anticuerpo monoclonal anti-CD3. Los ejemplos ilustrativos de anticuerpos CD3 incluyen, de modo no taxativo, OKT3, G19-4, BC3 y 64.1.

En otra modalidad, se puede utilizar un agente de unión a CD2 para brindar una señal de estimulación primaria a las células T. Los ejemplos ilustrativos de agentes de unión a CD2 incluyen, de modo no taxativo, ligandos de CD2 y anticuerpos anti-CD2, p. ej., el anticuerpo T11.3 en combinación con el anticuerpo T11.1 o T11.2 (Meuer, S. C. et ál. (1984) *Cell* 36:897-906) y el anticuerpo 9.6 (que reconoce el mismo epítipo que TI 1.1) en combinación con el anticuerpo 9-1 (Yang, S. Y. et ál. (1986) *J. Immunol.* 137:1097-1100). También se pueden utilizar otros anticuerpos que se unan a los mismos epítipos que cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente. Los

anticuerpos o las combinaciones de anticuerpos adicionales se pueden preparar e identificar con técnicas estándar como se describe en otro punto en la presente.

5 Además de la señal de estimulación primaria que se brinda a través del complejo de TCR/CD3 o mediante CD2, la inducción de respuestas de células T requiere una segunda señal coestimuladora. En modalidades particulares, se puede utilizar un agente de unión a CD28 para brindar una señal
10 coestimuladora. Los ejemplos ilustrativos de agentes de unión a CD28 incluyen, de modo no taxativo: ligandos de CD 28 naturales, p. ej., ligando natural de CD28 (p. ej., un miembro de la familia B7 de proteínas, como B7-1(CD80) y B7-2 (CD86) y anticuerpo monoclonal anti-CD28 o fragmento de este que puede
15 reticular la molécula CD28, p. ej., los anticuerpos monoclonales 9.3, B-T3, XR-CD28, KOLT-2, 15E8, 248.23.2 y EX5.3D10.

En una modalidad, la molécula que brinda la señal de
20 estimulación primaria, por ejemplo, una molécula que brinda estimulación a través del complejo de TCR/CD3 o CD2 y la molécula coestimuladora se acoplan a la misma superficie.

En determinadas modalidades, los agentes de unión que brindan

señales estimuladoras y coestimuladoras se ubican en la superficie de una célula. Esto se puede lograr transfectando o transduciendo una célula con un ácido nucleico que codifica el agente de unión en una forma adecuada para su expresión en la
5 superficie celular o, de forma alternativa, mediante acoplamiento de un agente de unión a la superficie celular.

En otra modalidad, la molécula que brinda la señal de estimulación primaria, por ejemplo, una molécula que brinda
10 estimulación a través del complejo de TCR/CD3 o CD2 y la molécula coestimuladora se expresan en células que presentan el antígeno.

En una modalidad, la molécula que brinda la señal de
15 estimulación primaria, por ejemplo, una molécula que brinda estimulación a través del complejo de TCR/CD3 o CD2 y la molécula coestimuladora se brindan en superficies separadas.

En una modalidad determinada, uno de los agentes de unión que
20 brinda señales estimuladoras y coestimuladoras es soluble (se brinda en solución) y el o los otros agentes se brindan en una o más superficies.

En una modalidad particular, los agentes de unión que brindan

señales estimuladoras y coestimuladoras se brindan ambos en forma soluble (en solución).

En diversas modalidades, los métodos para elaborar las células T contemplados en la presente comprenden activar las células T con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28.

Las composiciones de células T elaboradas con los métodos contemplados en la presente comprenden células T activadas y/o expandidas en presencia de uno o más agentes que inhiben una vía de señalización celular de PI3K. Las células T modificadas para expresar un CAR anti-BCMA se pueden activar y expandir antes y/o después de modificar las células T. En modalidades particulares, una población de células T se activa, modifica para expresar un CAR anti-BCMA y luego se cultiva para expansión.

En una modalidad, las células T elaboradas con los métodos contemplados en la presente comprenden una mayor cantidad de células T que expresan marcadores que indican un potencial de proliferación elevado y la capacidad de autorrenovarse, pero no expresan o expresan marcadores sustancialmente indetectables de diferenciación de células T. Estas células T se pueden activar de forma repetida y expandirse de forma potente y así brindar

una mejor composición de células T terapéutica.

En una modalidad, una población de células T activada y
expandida en presencia de uno o más agentes que inhiben una vía
5 de señalización celular de PI3K se expande al menos 1.5 veces,
al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos
5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces,
al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al
menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 250 veces, al
10 menos 500 veces, al menos 1000 veces o más, en comparación con
una población de células T activadas y expandidas sin un
inhibidor de PI3K.

En una modalidad, una población de células T caracterizada por
15 la expresión de células T jóvenes marcadoras activadas y
expandidas en presencia de uno o más agentes que inhiben una
vía de señalización celular de PI3K se expande al menos 1.5
veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al
menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8
20 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces,
al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 250 veces, al
menos 500 veces, al menos 1000 veces o más, en comparación con
la población de células T activadas y expandidas sin un
inhibidor de PI3K.

En una modalidad, las células T expandidas activadas con los métodos contemplados en la presente comprenden además cultivo de una población de células que comprende células T durante
5 varias horas (alrededor de 3 horas) a alrededor de 7 días a alrededor de 28 días o cualquier valor horario entero intermedio. En otra modalidad, la composición de células T puede cultivarse durante 14 días. En una modalidad particular, las células T se cultivan durante alrededor de 21 días. En otra
10 modalidad, las composiciones de células T se cultivan durante alrededor de 2-3 días. También pueden ser deseables diversos ciclos de estimulación/activación/expansión, por lo que el tiempo de cultivo de las células T puede ser de 60 días o más.

15 En modalidades particulares, las condiciones adecuadas para el cultivo de células T incluyen un medio adecuado (p. ej., medio esencial mínimo o medio RPMI 1640 o X-vivo 15 (Lonza)) y uno o más factores necesarios para proliferación y viabilidad que incluyen, de modo no taxativo, suero (p. ej., suero humano o
20 bovino fetal), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, IL-7, IL-21, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β y TNF- α o cualquier otro aditivo adecuado para el crecimiento de células conocido por el experto en la técnica.

Otros ejemplos ilustrativos del medio de cultivo celular incluyen, de modo no taxativo, RPMI 1640, Clicks, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 1 5 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos agregados, piruvato sódico y vitaminas, libres de
5 suero o suplementados con una cantidad adecuada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas y/o una cantidad de citocina/s suficiente para el crecimiento y la expansión de células T.

10 Los ejemplos ilustrativos de otros aditivos para expansión de células T incluyen, de modo no taxativo, tensioactivo, piasminato, amortiguadores de pH, como HEPES y agentes de reducción como N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol.

15 Se incluyen antibióticos, p. ej., penicilina y estreptomicina, solamente en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se deben infundir en un sujeto. Las células objetivo se mantienen en condiciones necesarias para sustentar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura adecuada (p. ej., 37
20 °C) y atmósfera adecuada (p. ej., aire más CO₂ al 5 %).

En modalidades particulares, las PBMC o células T aisladas entran en contacto con un agente estimulador y agentes coestimuladores, como anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28,

generalmente unidos a una microesfera u otra superficie, en un medio de cultivo con citocinas adecuadas, como IL-2, IL-7 y/o IL-15.

5 En otras modalidades, las APC artificiales (aAPC) se realizan mediante modificación de células K562, U937, 721.221, T2 y C1R para dirigir la expresión y secreción estables de diversas citocinas y moléculas coestimuladoras. En una modalidad particular, se utilizan aAPC K32 o U32 para dirigir la
10 expresión de una o más moléculas estimuladoras basadas en anticuerpo en la superficie de células AAPC. Las poblaciones de células T se pueden expandir mediante aAPC que expresan diversas moléculas coestimuladoras y que incluyen, de modo no taxativo, CD137L (4-1BBL), CD134L (OX40L) y/o CD80 o CD86. Por
15 último, las APC brindan una plataforma eficaz para expandir células T genéticamente modificadas y mantener la expresión de CD28 en células T CD8. Las aAPC que se brindan en WO 03/057171 y US2003/0147869 se incorporan en la presente en su totalidad mediante esta referencia.

20

3. AGENTES

En diversas modalidades, se brinda un método para elaborar células T que expande células T potentes en su desarrollo o no diferenciadas que comprende poner en contacto células T con un

agente que modula una vía de PI3K en las células. En diversas modalidades, se brinda un método para elaborar células T que expande células T potentes en su desarrollo o no diferenciadas que comprende poner en contacto células T con un agente que
5 modula una vía de PI3K/AKT/mTOR en las células. Las células pueden entrar en contacto antes, durante y/o después de la activación y expansión. Las composiciones de células T retienen una potencia de célula T suficiente para poder someterse a múltiples rondas de expansión sin aumento sustancial en la
10 diferenciación.

Tal como se utilizan en la presente, los términos «modular», «modulador» o «agente modulador» o términos comparables hacen referencia a la capacidad de un agente de provocar un cambio en
15 una vía de señalización celular. Un modulador puede aumentar o disminuir una cantidad, actividad de un componente de la vía o aumentar o disminuir un efecto o resultado deseado de una vía de señalización celular. En una modalidad, el modulador es un inhibidor. En otra modalidad, el modulador es un activador.

20

Un «agente» hace referencia a un compuesto, una molécula pequeña, p. ej., molécula orgánica pequeña, ácido nucleico, polipéptido o un fragmento, una isoforma, una variante, un análogo o derivado de estos que se utiliza en la modulación de

una vía de PI3K/AKT/mTOR.

Una «molécula pequeña» hace referencia a una composición con un peso molecular menor a alrededor de 5 kD, menor a alrededor de 4 kD, menor a alrededor de 3 kD, menor a alrededor de 2 kD, menor a alrededor de 1 kD o menor a alrededor de .5 kD. Las moléculas pequeñas pueden comprender ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, peptoides, carbohidratos, lípidos, componentes de estos u otras moléculas orgánicas o inorgánicas. En la técnica se conocen las genotecas de mezclas químicas y/o biológicas, como fúngicas, bacterianas o extractos de algas y se pueden analizar con cualquiera de los ensayos de la invención. Se pueden encontrar ejemplos de métodos para la síntesis de genotecas moleculares en: (Carell et ál., 1994a; Carell et ál., 1994b; Cho et ál., 1993; DeWitt et ál., 1993; Gallop et ál., 1994; Zuckermann et ál., 1994).

Un «análogo» hace referencia a un compuesto orgánico pequeño, un nucleótido, una proteína o un polipéptido que posee actividad o funciones similares o idénticas al compuesto, el nucleótido, la proteína o el polipéptido o compuesto con la actividad deseada de la presente invención, pero no comprende necesariamente una secuencia o estructura similar o idéntica a la secuencia o estructura de la modalidad preferida.

Un «derivado» hace referencia a un compuesto, una proteína o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína original o un polipéptido alterado mediante introducción de sustituciones, eliminaciones o adiciones de residuos de aminoácidos o un ácido nucleico o nucleótido modificado mediante introducción de sustituciones o eliminaciones, adiciones o mutaciones de nucleótidos. El ácido nucleico, nucleótido, proteína o polipéptido derivado posee una función similar o idéntica al polipéptido original.

En diversas modalidades, el agente que modula la vía de PI3K activa un componente de la vía. Un «activador» o «agonista» hace referencia a un agente que promueve, aumenta o induce una o más actividades de una molécula en una vía de PI3K/AKT/mTOR que incluye, de modo no taxativo, una molécula que inhibe una o más actividades de una PI3K.

En diversas modalidades, el agente que modula una vía de PI3K inhibe un componente de la vía. Un «inhibidor» o «antagonista» hace referencia a un agente que inhibe, disminuye o reduce una o más actividades de una molécula en una vía de PI3K incluida, de modo no taxativo, una PI3K. En una modalidad, el inhibidor es un inhibidor de molécula doble. En una modalidad particular,

el inhibidor puede inhibir una clase de moléculas con actividades iguales o sustancialmente similares (un inhibidor pan) o puede inhibir de forma específica la actividad de una molécula (un inhibidor selectivo o específico). La inhibición
5 también puede ser reversible o irreversible.

En una modalidad, el inhibidor tiene una IC₅₀ de al menos 1 nM, al menos 2 nM, al menos 5 nM, al menos 10 nM, al menos 50 nM, al menos 100 nM, al menos 200 nM, al menos 500 nM, al menos 1
10 µM, al menos 10 µM, al menos 50 µM o al menos 100 µM. Las determinaciones de IC₅₀ se pueden lograr utilizando cualquier técnica convencional conocida en la técnica. Por ejemplo, una IC₅₀ se puede determinar midiendo la actividad de una enzima específica en presencia de un espectro de concentraciones del
15 inhibidor que en estudio. Los valores obtenidos de forma experimental de la actividad enzimática luego se grafican en función de las concentraciones de inhibidor utilizadas. La concentración del inhibidor que muestra 50 % de actividad enzimática (en comparación con la actividad en ausencia de
20 cualquier inhibidor) se toma como el valor de «IC₅₀». De forma análoga, se pueden definir otras concentraciones inhibidoras mediante determinaciones de actividad adecuadas.

En diversas modalidades, las células T entran en contacto o se

tratan o cultivan con uno o más moduladores de una vía de PI3K a una concentración de al menos 1 nM, al menos 2 nM, al menos 5 nM, al menos 10 nM, al menos 50 nM, al menos 100 nM, al menos 200 nM, al menos 500 nM, al menos 1 μ M, al menos 10 μ M, al menos 50 μ M, al menos 100 μ M o al menos 1 M.

En modalidades particulares, las células T se pueden poner en contacto o tratarse o cultivarse con uno o más moduladores de una vía de PI3K durante al menos 12 horas, 18 horas, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, al menos 2 semanas, al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses o más con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más rondas de expansión.

a. Vía de PI3K/Akt/mTOR

15

El objetivo fosfatidil-inositol-3 cinasa/Akt/mamífero de la vía de rapamicina sirve como conducto para integrar la señalización del factor de crecimiento con proliferación, diferenciación, metabolismo y supervivencia celular. Las PI3K son una familia de cinasas lipídicas intracelulares altamente conservadas. Las PI3K de clase IA se activan mediante receptores tirosina cinasa (RTK, por su sigla en inglés) del factor de crecimiento, de forma directa o mediante interacción con la familia de moléculas adaptadoras del sustrato receptor de insulina. Esta

20

actividad genera la producción de fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato (PIP3, por su sigla en inglés), un regulador de serina/treonina cinasa Akt. El mTOR actúa a través de la vía de PI3K canónica mediante 2 complejos distintos, cada uno
5 caracterizado por diferentes compañeros de unión que confieren distintas actividades. El mTORC1 (mTOR en complejo con PRAS40, raptor y mLST8/GbL) actúa como efector corriente abajo de la señalización de PI3K/Akt y así enlazan señales del factor de crecimiento con traducción proteica, crecimiento, proliferación
10 y supervivencia celular. El mTORC2 (mTOR en complejo con rictor, mSIN1, protor y mLST8) actúa como activador corriente arriba de Akt.

Luego de activación de PI3K mediada por el receptor del factor
15 de crecimiento, se recluta Akt en la membrana a través de la interacción de su dominio de homología pleckstrina con PIP3, con lo cual se expone su bucle de activación y se permite la fosforilación en treonina 308 (Thr308) mediante la proteína cinasa 1 dependiente de fosfoinosítido constitutivamente activo
20 (PDK1, por su sigla en inglés). Para activación máxima, la Akt también se fosforila mediante mTORC2, en la serina 473 (Ser473) de su motivo hidrofóbico del extremo C. También se ha demostrado que el ADN-PK y HSP son importantes en la regulación de la actividad Akt. La Akt activa mTORC1 a través de

fosforilación inhibidora de TSC2, que junto con TSC1 regula de forma negativa mTORC1 mediante inhibición de la GTPasa Rheb, un regulador positivo de mTORC1. mTORC1 tiene 2 sustratos bien definidos, p70S6K (indicado en lo sucesivo como S6K1) y 4E-BP1, 5 ambos reguladores esenciales de la síntesis de proteínas. Por lo tanto, mTORC1 es un importante efector corriente abajo de PI3K, que vincula la señalización del factor de crecimiento con traducción de proteína y proliferación celular.

10 b. Inhibidores de PI3K

Tal como se utiliza en la presente, el término «inhibidor de PI3K» hace referencia a un ácido nucleico, péptido, compuesto o molécula orgánicas pequeñas que se une a PI3K e inhibe al menos 15 una actividad de esta. Las proteínas PI3K se pueden dividir en tres clases, PI3K de clase 1, PI3K de clase 2 y PI3K de clase 3. Las PI3K de clase 1 existen como heterodímeros que consisten en una de cuatro subunidades catalíticas p110 (p110 α , p110 β , p110 δ y p110 γ) y una de dos familias de subunidades 20 reguladoras. Un inhibidor de PI3K de la presente invención se dirige preferentemente a los inhibidores de PI3K de clase 1. En una modalidad, un inhibidor de PI3K presenta selectividad con respecto a una o más isoformas de los inhibidores de PI3K de clase 1 (es decir, selectividad con respecto a p110 α , p110 β ,

p110 δ y p110 γ o uno o más de p110 α , p110 β , p110 δ y p110 γ). En otro aspecto, un inhibidor de PI3K no presenta selectividad de isoforma y se puede considerar un «inhibidor de pan-PI3K». En una modalidad, un inhibidor de PI3K compite con ATP por la
5 unión al dominio catalítico de PI3K.

En determinadas modalidades, un inhibidor de PI3K puede, por ejemplo, dirigirse a PI3K, así como a proteínas adicionales en la vía de PI3K-AKT-mTOR. En modalidades particulares, un
10 inhibidor de PI3K que se dirige tanto a mTOR como a PI3K se puede indicar como un inhibidor de mTOR o un inhibidor de PI3K. Un inhibidor de PI3K que se dirige solamente a PI3K puede indicarse como un inhibidor selectivo de PI3K. En una modalidad, puede comprenderse que un inhibidor selectivo de
15 PI3K hace referencia a un agente que presenta una concentración inhibidora del 50 % con respecto a PI3K, que es al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces o más menor a la IC₅₀ del inhibidor con respecto a mTOR y/u otras proteínas en la
20 vía.

En una modalidad particular, los ejemplos de inhibidores de PI3K inhiben PI3K con una IC₅₀ (concentración que inhibe el 50 % de la actividad) de alrededor de 200 nM o menos,

preferentemente alrededor de 100 nm o menos, incluso más preferentemente alrededor de 60 nM o menos, alrededor de 25 nM, alrededor de 10 nM, alrededor de 5 nM, alrededor de 1 nM, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 1 μ M, o menos. En una modalidad, un
5 inhibidor de PI3K inhibe PI3K con una IC₅₀ de entre alrededor de 2 nM y alrededor de 100 nm, más preferentemente entre alrededor de 2 nM y alrededor de 50 nM, incluso más preferentemente entre alrededor de 2 nM y alrededor de 15 nM.

10 Los ejemplos ilustrativos de inhibidores de PI3K adecuados para uso en los métodos de fabricación de células T contemplados en la presente incluyen, de modo no taxativo, BKM120 (inhibidor de PI3K de clase 1, Novartis), XL147 (inhibidor de PI3K de clase 1, Exelisis), (inhibidor de pan-PI3K, GlaxoSmithKline) y PX-866
15 (inhibidor de PI3K de clase 1, isoformas p110 α , p110 β y p110 γ , Oncothyreon).

Otros ejemplos ilustrativos de inhibidores selectivos de PI3K incluyen, de modo no taxativo, BYL719, GSK2636771, TGX-221,
20 AS25242, CAL-101, ZSTK474 y IPI-145.

Otros ejemplos ilustrativos de inhibidores de pan-PI3K incluyen, de modo no taxativo, BEZ235, LY294002, GSK1059615, TG100713 y GDC-0941.

c. Inhibidores de AKT

Tal como se utiliza en la presente, el término «inhibidor de AKT» hace referencia a un ácido nucleico, péptido, compuesto o molécula orgánica pequeña que inhibe al menos una actividad de AKT. Los inhibidores de AKT se pueden agrupar en diversas clases, incluidos inhibidores basados en lípidos (p. ej., inhibidores que se dirigen al dominio de homología de pleckstrina de AKT que evita la localización de AKT en membranas plasmáticas), inhibidores competitivos de ATP e inhibidores alostéricos. En una modalidad, los inhibidores de AKT actúan mediante unión con el lugar catalítico de AKT. En una modalidad particular, los inhibidores de Akt actúan inhibiendo la fosforilación de objetivos de AKT corriente abajo, como mTOR. En otra modalidad, la actividad de AKT se inhibe inhibiendo las señales de entrada para activar Akt mediante inhibición, por ejemplo, de la activación de ADN-PK de AKT, activación de PDK-1 de AKT y/o activación de mTORC2 de Akt.

20

Los inhibidores de AKT pueden dirigirse a las tres isoformas de AKT, AKT1, AKT2, AKT3 o pueden ser selectivos de la isoforma y dirigirse solamente a una o dos de las isoformas de AKT. En una modalidad, un inhibidor de AKT puede dirigirse a AKT, así como

a proteínas adicionales en la vía de PI3K-AKT-mTOR. Un inhibidor de AKT que se dirige solamente a AKT puede indicarse como un inhibidor selectivo de AKT. En una modalidad, puede comprenderse que un inhibidor selectivo de AKT hace referencia a un agente que presenta una concentración inhibidora del 50 % con respecto a AKT, que es al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces o más menor a la IC₅₀ del inhibidor con respecto a otras proteínas en la vía.

10

En una modalidad particular, los ejemplos de inhibidores de AKT inhiben AKT con una IC₅₀ (concentración que inhibe el 50 % de la actividad) de alrededor de 200 nM o menos, preferentemente alrededor de 100 nm o menos, incluso más preferentemente alrededor de 60 nM o menos, alrededor de 25 nM, alrededor de 10 nM, alrededor de 5 nM, alrededor de 1 nM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 1 µM, o menos. En una modalidad, un AKT inhibe AKT con una IC₅₀ de entre alrededor de 2 nM y alrededor de 100 nm, más preferentemente entre alrededor de 2 nM y alrededor de 50 nM, incluso más preferentemente entre alrededor de 2 nM y alrededor de 15 nM.

20

Los ejemplos ilustrativos de inhibidores de AKT para uso en combinación con conjugados de anticuerpo-fármaco basados en

auristatina incluyen, por ejemplo, perifosina (Keryx), MK2206 (Merck), VQD-002 (VioQuest), XL418 (Exelixis), GSK690693, GDC-0068 y PX316 (PROLX Pharmaceuticals).

- 5 Un ejemplo ilustrativo y no taxativo de un inhibidor selectivo de Akt1 es A-674563.

Un ejemplo ilustrativo y no taxativo de un inhibidor selectivo de Akt2 es CCT128930.

10

En modalidades particulares, la activación de ADN-PK del inhibidor de Akt de Akt, activación de PDK-1 de Akt, activación de mTORC2 de Akt o activación de HSP de Akt.

- 15 Los ejemplos ilustrativos de inhibidores de ADN-PK incluyen, de modo no taxativo, NU7441, PI-103, NU7026, PIK-75 y PP-121.

d. Inhibidores de mTOR

- 20 Los términos «inhibidor de mTOR» o «agente que inhibe mTOR» hacen referencia a un ácido nucleico, péptido, compuesto o molécula orgánica pequeña que inhibe al menos una actividad de una proteína de mTOR como, por ejemplo, la actividad de la proteína cinasa serina/treonina en al menos uno de sus

sustratos (p. ej., cinasa p70S6 1, 4E-BP1, AKT/PKB y eEF2). Los inhibidores de mTOR pueden unirse directamente a mTORC1, mTORC2 o mTORC1 y mTORC2 e inhibirlos.

5 La inhibición de la actividad de mTORC1 y/o mTORC2 se puede determinar mediante una reducción en la transducción de señal de la vía de PI3K/Akt/mTOR. Se puede utilizar una amplia variedad de lecturas para establecer una reducción del producto de esta vía de señalización. Algunos ejemplos no taxativos de
10 lecturas incluyen (1) una disminución en la fosforilación de Akt en residuos que incluyen, de modo no taxativo, 5473 y T308, (2) una disminución en la activación de Akt según se observa, por ejemplo, mediante una reducción de la fosforilación de sustratos de Akt que incluyen, de modo no taxativo, Fox01/O3a
15 T24/32, GSK3a/ β ; S21/9 y TSC2 T1462, (3) una disminución en la fosforilación de moléculas de señalización corriente abajo de mTOR que incluyen, de modo no taxativo, 70S6K T389, 4EBP1 T37/46 y S6 S240/244 ribosómica y (4) inhibición de la proliferación de células cancerosas.

20

En una modalidad, los inhibidores de mTOR son inhibidores del lugar activo. Estos son inhibidores de mTOR que se unen al lugar de unión a ATP (también indicado como cavidad de unión a ATP) de mTOR e inhiben la actividad catalítica de mTORC1 y

mTORC2. Una clase de inhibidores del lugar activo adecuados para uso en los métodos de fabricación de células T contemplados en la presente son inhibidores de especificidad doble que se dirigen e inhiben directamente a PI3K y mTOR. Los
5 inhibidores de especificidad doble se unen al lugar de unión a ATP de mTOR y PI3K. Los ejemplos ilustrativos de estos inhibidores incluyen, de modo no taxativo: imidazoquinazolinas, wortmannina, LY294002, PI-103 (Cayman Chemical), SF1126 (Semafore), BGT226 (Novartis), XL765 (Exelixis) y NVP-BEZ235
10 (Novartis).

Otra clase de inhibidores del lugar activo de mTOR adecuados para uso en los métodos contemplados en la presente inhibe de forma selectiva la actividad de mTORC1 y mTORC2 con respecto a
15 una o más fosfatidilinositol 3 cinasas tipo I, p. ej., cinasa PI3 α , β , γ o δ . Estos inhibidores del lugar activo se unen al lugar activo de mTOR, pero no PI3K. Los ejemplos ilustrativos de estos inhibidores incluyen, de modo no taxativo: pirazolopirimidinas, Torin1 (Guertin y Sabatini), PP242 (2-(4-amino-1-isopropil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-1H-indol-5-
20 ol), PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth) y AZD8055 (Liu et ál., Nature Review, 8, 627-644, 2009). I

En una modalidad, un inhibidor selectivo de mTOR hace referencia a un agente que presenta una concentración inhibidora del 50 % (IC50) con respecto a mTORC1 y/o mTORC2, que es al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, 5 al menos 100 veces, al menos 1000 veces o más menos a la IC50 del inhibidor con respecto a una, dos, tres o más PI3 cinasas tipo I o a todas las PI3-cinasas de tipo I.

Otra clase de inhibidores de mTOR para uso en la presente 10 invención se indica en la presente como «rapálogos». Tal como se utiliza en la presente, el término «rapálogos» hace referencia a compuestos que se unen de forma específica al dominio FRB de mTOR (dominio de unión a rapamicina RKBP), se encuentran estructuralmente relacionados con rapamicina y 15 retienen las propiedades inhibidoras de mTOR. El término rapálogos excluye rapamicina. Los rapálogos incluyen ésteres, éteres, oximas, hidrazonas e hidroxilaminas de rapamicina, así como compuestos en los que los grupos funcionales en la estructura nuclear de rapamicina se encuentran modificados, por 20 ejemplo, mediante reducción u oxidación. Las sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos también se consideran derivados de rapamicina. Los ejemplos ilustrativos de rapálogos adecuados para uso en los métodos contemplados en la presente incluyen, de modo no taxativo, temsirolimus

(CC1779), everolimus (RAD001), deforolimus (AP23573), AZD8055 (AstraZeneca) y OSI-027 (OSI).

En una modalidad, el agente es el inhibidor de mTOR rapamicina
5 (sirolimus).

En una modalidad particular, los ejemplos de inhibidores de mTOR para uso en la presente invención inhiben mTORC1, mTORC2 o mTORC1 y mTORC2 con una IC50 (concentración que inhibe el 50 %
10 de la actividad) de alrededor de 200 nM o menos, preferentemente alrededor de 100 nm o menos, incluso más preferentemente alrededor de 60 nM o menos, alrededor de 25 nM, alrededor de 10 nM, alrededor de 5 nM, alrededor de 1 nM, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 1 μ M, o menos. En un aspecto, un
15 inhibidor de mTOR para uso en la presente invención inhibe mTORC1, mTORC2 o mTORC1 y mTORC2 con una IC50 de entre alrededor de 2 nM y alrededor de 100 nm, más preferentemente entre alrededor de 2 nM y alrededor de 50 nM, incluso más preferentemente entre alrededor de 2 nM y alrededor de 15 nM.

20

En una modalidad, los ejemplos de inhibidores de mTOR inhiben PI3K y mTORC1 o mTORC2 o ambos de mTORC1 y mTORC2 y PI3K con una IC50 (concentración que inhibe el 50 % de la actividad) de alrededor de 200 nM o menos, preferentemente alrededor de 100

nm o menos, incluso más preferentemente alrededor de 60 nM o menos, alrededor de 25 nM, alrededor de 10 nM, alrededor de 5 nM, alrededor de 1 nM, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 1 μ M, o menos. En un aspecto, un inhibidor de mTOR para uso en la
5 presente invención inhibe PI3K y mTORC1 o mTORC2 o ambos de mTORC1 y mTORC2 y PI3K con una IC50 de entre alrededor de 2 nM y alrededor de 100 nm, más preferentemente entre alrededor de 2 nM y alrededor de 50 nM, incluso más preferentemente entre alrededor de 2 nM y alrededor de 15 nM.

10

Los ejemplos ilustrativos adicionales de inhibidores de mTOR adecuados para uso en modalidades particulares contempladas en la presente incluyen, de modo no taxativo, AZD8055, INK128, rapamicina, PF-04691502 y everolimus.

15

Se ha mostrado que mTOR demuestra una actividad catalítica potente y específica hacia las proteínas del sustrato fisiológico, proteína cinasa ribosómica p70 S6 I (p70S6K1) y proteína de unión a eIF4E 1 (4EBP1), según la medición con
20 anticuerpos específicos del fósforo en transferencia Western.

En una modalidad, el inhibidor de la vía de PI3K/AKT/mTOR es un inhibidor de cinasa s6 seleccionado del grupo que consiste en: BI-D1870, H89, PF-4708671, FMK y AT7867.

I. COMPOSICIONES Y FORMULACIONES

Las composiciones contempladas en la presente pueden comprender uno o más polipéptidos, polinucleótidos, vectores que los
5 comprenden, células efectoras inmunes genéticamente modificadas, etc., como se contempla en la presente. Las composiciones incluyen, de modo no taxativo, composiciones farmacéuticas. Una «composición farmacéutica» hace referencia a una composición formulada en soluciones farmacéuticamente
10 aceptables o fisiológicamente aceptables para administración a una célula o un animal, sola o en combinación con una o más modalidades adicionales de terapias. También se comprenderá que, si se desea, las composiciones de la invención se pueden administrar también en combinación con otros agentes como, p.
15 ej., citocinas, factores de crecimiento, hormonas, moléculas pequeñas, quimioterapéuticos, profármacos, fármacos, anticuerpos u otros diversos agentes farmacéuticamente activos. No existe virtualmente ningún límite para otros componentes que también se puedan incluir en las composiciones, siempre que los
20 agentes adicionales no afecten de forma adversa la capacidad de la composición de suministrar la terapia pretendida.

La frase «farmacéuticamente aceptable» se usa en la presente para hacer referencia a los compuestos, los materiales, las

composiciones y/o las formas de dosificación adecuados, dentro del alcance del buen criterio médico, para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin provocar toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación excesivos, según una relación beneficio/riesgo razonable.

Tal como se utiliza en la presente, «portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables» incluye, de modo no taxativo, todo adyuvante, portador, excipiente, emoliente, agente edulcorante, diluyente, conservante, tinte/colorante, potenciador del sabor, tensioactivo, agente humectante, agente de dispersión, agente de suspensión, estabilizante, agente isotónico, solvente, tensioactivo o emulsionante aprobado por la Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos como aceptable para su uso en humanos o animales domésticos. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, de modo no taxativo, azúcares, como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, como almidón de maíz y almidón de papa; celulosa y sus derivados, como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto; malta; gelatina; talco; manteca de cacao, ceras, grasas animales y vegetales, parafinas, siliconas, bentonitas, ácido silícico, óxido de cinc; aceites, como aceite de cacahuete, aceite se

semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, como butilenglicol; polioles, como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, como oleato de etilo y laurato de etilo; ágar; agentes amortiguadores, como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógeno; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones amortiguadoras de fosfato y cualquier otra sustancia compatible que se utilice en composiciones farmacéuticas.

En modalidades particulares, las composiciones de la presente invención comprenden una cantidad de células efectoras inmunes que expresan CAR contempladas en la presente. Tal como se utiliza en la presente, el término «cantidad» hace referencia a «una cantidad eficaz» o «una eficaz cantidad» de una célula terapéutica genéticamente modificada, p. ej., célula T, para lograr un resultado profiláctico o terapéutico deseado o beneficioso, incluidos resultados clínicos.

20

Una «cantidad profilácticamente eficaz» hace referencia a una cantidad de una célula terapéutica genéticamente modificada eficaz para lograr el resultado profiláctico deseado. De forma habitual, pero no necesaria, dado que se utiliza una dosis

profiláctica en los sujetos antes o en una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz es menor a la cantidad terapéuticamente eficaz.

5 Una «cantidad terapéuticamente eficaz» de una célula terapéutica genéticamente modificada puede variar según factores como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, así como la capacidad de las células madre y progenitoras de provocar una respuesta deseada en el
10 individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una cantidad en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del virus o las células terapéuticas transducidas se ve superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. El término «cantidad terapéuticamente eficaz» incluye una cantidad eficaz
15 para «tratar» un sujeto (p. ej., un paciente). Cuando se indica una cantidad terapéutica, un médico puede determinar la cantidad exacta de las composiciones de la presente invención que se debe administrar, teniendo en cuenta las diferencias individuales de edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la
20 infección o metástasis y afección del paciente (sujeto). En general, se puede establecer que una composición farmacéutica que comprenda las células T descrita en la presente se puede administrar en una dosificación de 10^2 a 10^{10} células/kg de peso corporal, preferentemente 10^5 a 10^6 células/kg de peso

corporal, incluidos todos los valores enteros dentro de estos intervalos. La cantidad de células dependerá del uso final para el cual se pretenda la composición, así como el tipo de células que allí se incluyan. Para los usos que se indican en la

5 presente, las células generalmente se encuentran en un volumen de un litro o menos y pueden ser de 500 mL o menos, incluso 250 mL o 100 mL o menos. Por lo tanto, la densidad de las células deseadas típicamente es mayor a 10^6 células/mL y generalmente es superior a 10^7 células/mL, generalmente 10^8 células/mL o

10 superior. La cantidad clínicamente relevante de células inmunes puede prorratearse en múltiples infusiones que acumuladas alcancen o superen 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} o 10^{12} células. En algunos aspectos de la presente invención, en particular dado que todas las células infundidas se redirigen

15 hacia un antígeno objetivo particular (p. ej., cadena ligera κ o λ), se pueden administrar cantidades menores de células, en el intervalo de 10^6 /kilogramo (10^6 - 10^{11} por paciente). Las composiciones celulares con expresión de CAR se pueden administrar múltiples veces en dosis dentro de estos

20 intervalos. Las células pueden ser alogénicas, singénicas, xenogénicas o autólogas para el paciente que se someta a la terapia. Si se desea, el tratamiento también puede incluir administración de mitógenos (p. ej., PHA) o linfocinas, citocinas y/o quimiocinas (p. ej., IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF-

alfa, IL-18 y TNF-beta, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 α , etc.), como se describe en la presente para potenciar la inducción de la respuesta inmunitaria.

5 En general, las composiciones que comprenden las células activadas y expandidas como se describe en la presente se pueden utilizar en el tratamiento y la prevención de enfermedades que surjan en individuos inmunocomprometidos. En particular, las composiciones que comprenden las células T
10 modificadas con CAR contempladas en la presente se utilizan en el tratamiento de neoplasias de células B. Las células T modificadas con CAR de la presente invención se pueden administrar solas o como una composición farmacéutica en combinación con portadores, diluyentes, excipientes y/o con
15 otros componentes como IL-2 u otras citocinas o poblaciones celulares. En modalidades particulares, las composiciones farmacéuticas contempladas en la presente comprenden una cantidad de células T genéticamente modificadas, en combinación con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéutica
20 o fisiológicamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención que comprenden una población de células efectoras inmunes con expresión de CAR, como células T, pueden comprender

amortiguadores como solución salina amortiguada neutra, solución salina amortiguada con fosfato y similares; carbohidratos como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos como glicina; 5 antioxidantes; agentes quelantes como EDTA o glutathione; adyuvantes (p. ej., hidróxido de aluminio) y conservantes. Las composiciones de la presente invención se formulan preferentemente para administración parenteral, p. ej., administración intravascular (intravenosa o intraarterial), 10 intraperitoneal o intramuscular.

Las composiciones farmacéuticas líquidas, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, pueden incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles como agua para inyección, 15 solución salina, preferentemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como medio de suspensión o solvente, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes; agentes antibacterianos como 20 alcohol bencílico o metilparabeno; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfato de sodio; agentes quelantes como ácido etilendiaminotetraacético; amortiguadores como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para ajustar la tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral se puede

colocar en ampollas, jeringas descartables o frascos de dosis múltiples de vidrio o plástico. Una composición farmacéutica inyectable es preferentemente estéril.

5 En una modalidad particular, las composiciones contempladas en la presente comprenden una cantidad eficaz de células efectoras inmunes con expresión de CAR, solas o en combinación con uno o más agentes terapéuticos. Por lo tanto, las composiciones de células efectoras inmunes con expresión de CAR se pueden
10 administrar solas o en combinación con otros tratamientos contra el cáncer, como terapia de radiación, quimioterapia, trasplante, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia fotodinámica, etc. Las composiciones también se pueden administrar en combinación con antibióticos. Estos agentes
15 terapéuticos pueden aceptarse en la técnica como un tratamiento estándar para una enfermedad particular como se describe en la presente, como un cáncer particular. Los ejemplos de agentes terapéuticos que se contemplan incluyen citocinas, factores de crecimiento, esteroides, AINE, FARME, antiinflamatorios,
20 quimioterapéuticos, radioterapéuticos, anticuerpos terapéuticos u otros agentes activos y auxiliares.

En determinadas modalidades, las composiciones que comprenden células efectoras inmunes con expresión de CAR descritas en la

presente se pueden administrar en conjunto con cualquier cantidad de agentes quimioterapéuticos. Los ejemplos ilustrativos de agentes terapéuticos incluyen agentes alquilantes como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™);

5 sulfonatos de alquilo como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas como benzodopa, carbocadona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluidas altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosfaoramida y trimetilolomelamina resumidas;

10 mostazas de nitrógeno como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas como carmustina, clorozotocina, fotemustina,

15 lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina,

20 doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina;

antimetabolitos como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU);
 análogos de ácido fólico como denopterina, metotrexato,
 pteropterina, trimetrexato; análogos de purina como
 fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos
 5 de pirimidina como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina,
 carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina,
 enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos como calusterona,
 propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano,
 testolactona; antiadrenales como aminoglutetimida, mitotano,
 10 trilostano; regeneradores de ácido fólico como ácido frolínico;
 aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico;
 amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina;
 demecolcina; diazicuona; elfomitina; acetato de eliptinio;
 etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinano;
 15 lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina;
 pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-
 etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofirán;
 espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2, 2', 2''-
 triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina;
 20 mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano;
 gacitosina; arabinosida («Ara-C»); ciclofosfamida; tiotepa;
 taxoides, p. ej., paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb
 Oncology, Princeton, N.J.) y
 doxetaxel (TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia);

clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina;
 metotrexato; análogos de platino como cisplatino y
 carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP16);
 ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina;
 5 vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina;
 aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de
 topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); derivados
 de ácido retinoico como Targretin™ (bexaroteno),
 Panretin™ (alitretinoína); ONTAK™ (denileukin diftitox);
 10 esperamicinas; capecitabina y sales, ácidos o derivados
 farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.
 También se incluyen en esta definición agentes antihormonales
 que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en
 cánceres, como los antiestrógenos, que incluyen, por ejemplo,
 15 tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben la
 aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno,
 LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston) y antiandrógenos
 como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y
 goserelin y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente
 20 aceptables de cualquiera de los anteriores.

Se pueden utilizar otros diversos agentes terapéuticos en
 conjunto con las composiciones descritas en la presente. En una
 modalidad, la composición que comprende las células efectoras

inmunes que expresan CAR se administra con un agente antiinflamatorio. Los fármacos o agentes antiinflamatorios incluyen, de modo no taxativo, esteroides y glucocorticoides (incluidos etametasona, budesonida, dexametasona, acetato de 5 hidrocortisona, hidrocortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) incluidos aspirina, ibuprofeno, naproxeno, metotrexato, sulfasalazina, leflunomida y medicamentos anti-TNF, ciclofosfamida y 10 micofenolato.

Otros ejemplos de AINE se seleccionan del grupo que consiste en ibuprofeno, naproxeno, naproxeno sódico, inhibidores de Cox-2 como VIOXX® (rofecoxib) y CELEBREX® (celecoxib) y sialilatos.

15 Los ejemplos de analgésicos se seleccionan del grupo que consiste en acetaminofeno, oxicodona, tramadol de clorhidrato de proporxifeno. Los ejemplos de glucocorticoides se seleccionan del grupo que consiste en cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona o prednisona.

20 Los ejemplos de modificadores de la respuesta biológica incluyen moléculas dirigidas contra marcadores de la superficie celular (p. ej., CD4, CD5, etc.), inhibidores de citocina, como los antagonistas del TNF (p. ej., etanercept (ENBREL®), adalimumab (HUMIRA®) y infliximab (REMICADE®), inhibidores de

quimiocinas e inhibidores de moléculas de adhesión. Los modificadores de la respuesta biológica incluyen anticuerpos monoclonales, así como formas recombinantes de moléculas. Los ejemplos de FAME incluyen azatioprina, ciclofosfamida, 5 ciclosporina, metotrexato, penicilamina, leflunomida, sulfasalazina, hidroxicloroquina, oro ((auranofina) oral e intramuscular) y minociclina.

Los ejemplos ilustrativos de anticuerpos terapéuticos adecuados 10 para combinación con las células T modificadas con CAR contempladas en la presente incluyen, de modo no taxativo, bavituximab, bevacizumab (avastina), bivatuzumab, blinatumomab, conatumumab, daratumumab, duligotumab, dacetuzumab, dalotuzumab, elotuzumab (HuLuc63), gentuzumab, ibritumomab, 15 indatuximab, inotuzumab, lorvotuzumab, lucatumumab, milatuzumab, moxetumomab, ocaratuzumab, ofatumumab, rituximab, siltuximab, teprotumumab y ublituximab.

En determinadas modalidades, las composiciones descritas en la 20 presente se administran en conjunto con una citocina. Tal como se utiliza en la presente, «citocina» se incluye como un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan en otra célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de dichas citocinas son

linfocinas, monocinas y hormonas de polipéptidos tradicionales. Incluidas entre las citocinas se encuentran las hormonas de crecimiento como la hormona de crecimiento humano, la hormona de crecimiento humano de N-metionilo y la hormona de crecimiento bovino; la hormona paratiroidea; la tiroxina; la insulina; la proinsulina; la relaxina; la prorrelaxina; las hormonas de glicoproteína como la hormona folículoestimulante (FSH, por su sigla en inglés), la hormona estimulante de la tiroides (TSH, por su sigla en inglés) y la hormona luteinizante (LH, por su sigla en inglés); el factor de crecimiento hepático; el factor de crecimiento de fibroblastos; la prolactina; el lactógeno placentario; el factor de necrosis tumoral alfa y beta; la sustancia inhibidora mulleriana; el péptido asociado con gonadotropina de ratón; la inhibina; la activina; el factor de crecimiento endotelial vascular; la integrina; la trombopoyetina (TPO); los factores de crecimiento nervioso como NGF-beta; el factor de crecimiento de plaquetas; los factores de crecimiento transformadores (TGF, por su sigla en inglés) como TGF-alfa y TGF-beta; el factor de crecimiento tipo insulina I y II; la eritropoyetina (EPO); los factores osteoinductores; los interferones como interferón alfa, beta y gamma; los factores estimulantes de colonias (CSF, por su sigla en inglés) como CSF de macrófagos (M-CSF, por su sigla en inglés); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, por su sigla

en inglés) y CSF de granulocito (G-CSF, por su sigla en inglés); interleucinas (IL) como IL-1, IL-1alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, IL-21, un factor de necrosis tumoral como TNF-alfa o TNF-beta y
5 otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando kit (KL, por su sigla en inglés). Tal como se usa en la presente, el término citocina incluye proteínas de orígenes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia natural.

10

En modalidades particulares, una composición comprende células T de CAR contempladas en la presente que se cultivan en presencia de un inhibidor de PI3K como se describe en la presente y expresan uno o más de los siguientes marcadores:
15 CD3, CD4, CD8, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62, CD127 y HLA-DR se pueden aislar adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. En una modalidad, una composición comprende una subpoblación específica de células T que expresa uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en
20 CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197 y CD38 o CD62L, CD127, CD197 y CD38 se aísla adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. En diversas modalidades, las composiciones no expresan o no expresan de forma sustancial uno o más de los siguientes marcadores: CD57, CD244, CD160, PD-1,

CTLA4, TIM3 y LAG3.

En una modalidad, la expresión de uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD62L, CD127, CD197 y
 5 CD38 aumenta al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces o más en comparación con una población de células T activadas y expandidas sin un inhibidor de PI3K.

10

En una modalidad, la expresión de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 y LAG3 disminuye al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al
 15 menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces o más en comparación con una población de células T activadas y expandidas con un inhibidor de PI3K.

20 **J. MÉTODOS TERAPÉUTICOS**

Las células efectoras inmunes genéticamente modificadas contempladas en la presente brindan métodos mejorados de inmunoterapia adoptiva para uso en el tratamiento de afecciones relacionadas con células B que incluyen, de modo no taxativo,

afecciones inmunorreguladoras y neoplasias hematológicas.

En modalidades particulares, la especificidad de una célula efectora inmune primaria se redirige a células B mediante
5 modificación genética de la célula efectora inmune primaria con un CAR contemplado en la presente. En diversas modalidades, un vector viral se utiliza para modificar genéticamente una célula efectora inmune con un polinucleótido particular que codifica un CAR que comprende un dominio de unión al antígeno anti-BCMA
10 de murino que se une a un polinucleótido de BCMA, un dominio bisagra, un dominio transmembrana (TM), un enlazador oligo o polipeptídico corto que enlaza el dominio TM con el dominio de señalización intracelular del CAR y uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelular y un dominio de
15 señalización primaria.

En una modalidad, la presente invención incluye un tipo de terapia celular en la que las células T se modifican genéticamente para expresar un CAR que se dirige a células B
20 con expresión de BCMA. En otra modalidad, las células T de CAR anti-BCMA se cultivan en presencia de IL-2 y un inhibidor de PI3K para aumentar las propiedades terapéuticas y la persistencia de las células T de CAR. Las células T de CAR luego se infunden en un destinatario que lo necesite. Las

células infundidas pueden destruir las células B que provocan enfermedad en el destinatario. A diferencia de las terapias con anticuerpo, las células T de CAR pueden replicarse *in vivo*, lo que produce persistencia a largo plazo que puede llevar a una
5 terapia sostenida contra el cáncer.

En una modalidad, las células T de CAR de la invención pueden experimentar una fuerte expansión de células T *in vivo* y pueden persistir durante una cantidad de tiempo prolongada. En otra
10 modalidad, las células T de CAR de la invención evolucionan en células T de memoria específicas que pueden reactivarse para inhibir cualquier crecimiento o formación tumoral adicional.

En modalidades particulares, las composiciones que comprenden
15 células efectoras inmunes que comprenden los CAR contemplados en la presente se utilizan en el tratamiento de afecciones asociadas con actividad anormal de células B.

Los ejemplos ilustrativos de afecciones que se pueden tratar,
20 prevenir o mejorar utilizando las células efectoras inmunes que comprenden los CAR contempladas en la presente incluyen, de modo no taxativo: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, miastenia grave, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopenia idiopática, síndrome anti-

fosfolipídico, enfermedad de Chagas, enfermedad de Grave, granulomatosis de Wegener, poliarteritis nodosa, síndrome de Sjogren, pénfigo vulgar, escleroderma, esclerosis múltiple, síndrome antifosfolipídico, vasculitis asociada con ANCA, 5 enfermedad de Goodpasture, enfermedad de Kawasaki y glomerulonefritis de avance rápido.

Las células efectoras inmunes modificadas también se pueden aplicar en trastornos de células plasmáticas como enfermedad de 10 las cadenas pesadas, amiloidosis primaria o asociada con inmunocitos y gammapatía monoclonal de importancia indeterminada (MGUS, por su sigla en inglés).

Tal como se utiliza en la presente, «neoplasia de células B» 15 hace referencia a un tipo de cáncer que se forma en células B (un tipo de célula del sistema inmunológico), como se describe a continuación.

En modalidades particulares, las composiciones que comprenden 20 células T modificadas con CAR contempladas en la presente se utilizan en el tratamiento de neoplasias hematológicas que incluyen, de modo no taxativo, neoplasias de células B como, por ejemplo, mieloma múltiple (MM) y linfoma no Hodgkin (NHL).

El mieloma múltiple es una neoplasia de células B de morfología celular plasmática madura caracterizada por la transformación neoplásica de un único clon de estos tipos de células. Estas células plasmáticas proliferan en BM y pueden invadir los
5 huesos adyacentes y, en algunas oportunidades, la sangre. Diversas formas de mieloma múltiple incluyen mieloma múltiple manifiesto, mieloma múltiple quiescente, leucemia de células plasmáticas, mieloma no secretor, mieloma de IgD, mieloma osteoesclerótico, plasmacitoma solitario de los huesos y
10 plasmacitoma extramedular (remitirse, por ejemplo, Braunwald, et ál. (eds), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15ª edición (McGraw-Hill 2001)).

El linfoma no Hodgkin comprende un gran grupo de cánceres de
15 linfocitos (glóbulos blancos). Los linfomas no Hodgkin pueden producirse a cualquier edad y a menudo se encuentran marcados por nódulos linfáticos más grandes de lo normal, fiebre y pérdida de peso. Existen muchos tipos diferentes de linfoma no Hodgkin. Por ejemplo, el linfoma no Hodgkin se puede dividir en
20 los tipos agresivo (de crecimiento rápido) e indolente (de crecimiento lento). Si bien los linfomas no Hodgkin se pueden derivar de células B y células T, tal como se utilizan en la presente los términos «linfoma no Hodgkin» y «linfoma no Hodgkin de células B» se utilizan de forma intercambiable. Los

- linfomas no Hodgkin de células B (NHL) incluyen linfoma de Burkitt, leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño (LLC/LLP), linfoma de células B grandes difusas, linfoma folicular, linfoma de células grandes inmunoblásticas,
- 5 linfoma linfoblástico B precursor y linfoma de células del manto. Los linfomas que se producen luego de un trasplante de médula ósea o células madre a menudo son linfomas no Hodgkin de células B.
- 10 La leucemia linfocítica crónica (CLL) es un cáncer indolente (de crecimiento lento) que provoca un aumento lento de glóbulos blancos inmaduros que se denominan linfocitos B o células B. Las células cancerosas se esparcen a través de la sangre y la médula ósea y también pueden afectar los nódulos linfáticos u
- 15 otros órganos como el hígado y el bazo. La CLL eventualmente provoca insuficiencia de la médula ósea. Algunas veces, en etapas posteriores de la enfermedad, la enfermedad se denomina linfoma linfocítico pequeño.
- 20 En modalidades particulares, se brindan métodos que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células efectoras inmunes con expresión de CAR contempladas en la presente o una composición que las comprende a un paciente que lo necesite, solas o en combinación con uno o más agentes

terapéuticos. En determinadas modalidades, las células de la invención se utilizan en el tratamiento de pacientes en riesgo de desarrollar una afección asociada con actividad anormal de células B o una neoplasia de células B. Por lo tanto, la
5 presente invención brinda métodos para el tratamiento o la prevención de una afección asociada con actividad anormal de células B o una neoplasia de células B que comprenden administrarle a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de las células modificadas con CAR
10 contempladas en la presente.

Tal como se utilizan en la presente, los términos «individuo» y «sujeto» se utilizan a menudo de forma intercambiable y hacen referencia a cualquier animal que presente un síntoma de una
15 enfermedad, un trastorno o una afección que se pueda tratar con los vectores de terapia génica, los agentes terapéuticos basados en células y los métodos descritos en otros puntos de la presente. En modalidades preferidas, un sujeto incluye cualquier animal que presente síntomas de una enfermedad, un
20 trastorno o una afección del sistema hematopoyético, p. ej., una neoplasia de células B, que se pueda tratar con los vectores de terapia génica, los agentes terapéuticos basados en células y los métodos descritos en otros puntos en la presente. Los sujetos adecuados (p. ej., pacientes) incluyen animales de

laboratorio (como ratón, rata, conejo o cobayo), animales de granja y animales domésticos o mascotas (como un gato o perro). Se incluyen primates no humanos y, preferentemente, pacientes humanos. Los sujetos típicos incluyen pacientes humanos con una
5 neoplasia de células B, con diagnóstico de una neoplasia de células B o en riesgo de padecer o que padecen una neoplasia de células B.

Tal como se utiliza en la presente, el término «paciente» hace
10 referencia a un sujeto diagnosticado con una enfermedad, un trastorno o una afección que se pueda tratar con los vectores de terapia génica, los agentes terapéuticos basados en células y los métodos descritos en otros puntos de la presente.

15 Tal como se utiliza en la presente, «tratamiento» o «tratar» incluye cualquier efecto beneficioso o deseable en los síntomas o la patología de una enfermedad o afección patológica y puede incluir incluso reducciones mínimas en uno o más marcadores ponderables de la enfermedad o afección que se trate. El
20 tratamiento puede implicar opcionalmente la reducción o la mejora de los síntomas de la enfermedad o afección o el retraso del avance de la enfermedad o afección. «Tratamiento» no indica necesariamente erradicación completa o cura de la enfermedad o afección o los síntomas asociados con estas.

Tal como se utiliza en la presente, «prevenir» y palabras similares como «prevenido/a», «prevención», etc., indican un enfoque de prevención, inhibición o reducción de la probabilidad de aparición o recurrencia de una enfermedad o afección. También hace referencia al retraso del inicio o la recurrencia de una enfermedad o afección o el retraso en la aparición o recurrencia de los síntomas de una enfermedad o afección. Tal como se utiliza en la presente, «prevención» y palabras similares también incluye reducción en la intensidad, el efecto, los síntomas y/o la carga de una enfermedad o afección antes del inicio o la recurrencia de la enfermedad o afección.

«Potenciar» o «promover» o «aumentar» o «expandir» hacen referencia en términos generales a la capacidad de una composición contemplada en la presente, p. ej., una célula T genéticamente modificada o un vector que codifique un CAR, de producir, provocar o causar una mayor respuesta fisiológica (es decir, efectos corriente abajo), en comparación con la respuesta provocada por un vehículo o una composición/molécula de control. Una respuesta fisiológica ponderable puede incluir un aumento en la expansión, activación, persistencia de las células T y/o un aumento en la capacidad de destrucción de

células cancerosas, entre otras evidentes en función del conocimiento en la técnica y la descripción en la presente. Una cantidad «aumentada» o «potenciada» es típicamente una cantidad «estadísticamente significativa» y puede incluir un aumento
5 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (p. ej., 500, 1000 veces) (incluidos todos los enteros y puntos decimales intermedios y por encima de 1, p. ej., 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, etc.) la respuesta producida por el vehículo o una composición de control.

10

«Disminución», «menor», «aminorar», «reducir» o «abatir» hacen referencia en términos generales a la capacidad de una composición contemplada en la presente de producir, provocar o causar una respuesta fisiológica menor (es decir, efectos
15 corriente abajo), en comparación con la respuesta que provoca el vehículo o una composición/molécula de control. Una cantidad «menor» o «reducida» es típicamente una cantidad «estadísticamente significativa» y puede incluir una disminución 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20,
20 30 o más veces (p. ej., 500, 1000 veces) (incluidos todos los enteros y puntos decimales intermedio y por encima de 1, p. ej., 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, etc.) la respuesta (respuesta de referencia) producida por el vehículo, una composición de control o la respuesta en un linaje celular particular.

«Mantener», «conservar», «mantenimiento», «sin cambios», «sin cambios sustanciales» o «sin disminución sustancial» hacen referencia en términos generales a la capacidad de una
5 composición contemplada en la presente de producir, provocar o causar una menor respuesta fisiológica (es decir, efectos corriente abajo) en una célula, en comparación con la respuesta provocada por el vehículo, una composición/molécula de control o la respuesta en un linaje celular particular. Una respuesta
10 comparable es una que no sea significativamente diferente o ponderablemente diferente de la respuesta de referencia.

En una modalidad, un método para tratar una afección relacionada con células B en un sujeto que lo necesite
15 comprende administrar una cantidad eficaz, p. ej., cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprenda las células efectoras inmunes genéticamente modificadas contempladas en la presente. La cantidad y frecuencia de administración se determinarán según factores como la afección
20 del paciente y el tipo y la gravedad de la enfermedad del paciente, si bien las dosificaciones apropiadas pueden determinarse mediante ensayos clínicos.

En una modalidad, la cantidad de células T en la composición

que se administra al sujeto es de al menos 0.1×10^5 células, al menos 0.5×10^5 células, al menos 1×10^5 células, al menos 5×10^5 células, al menos 1×10^6 células, al menos 0.5×10^7 células, al menos 1×10^7 células, al menos 0.5×10^8 células, al menos 1×10^8 células, al menos 0.5×10^9 células, al menos 1×10^9 células, al menos 2×10^9 células, al menos 3×10^9 células, al menos 4×10^9 células, al menos 5×10^9 células o al menos 1×10^{10} células. En modalidades particulares, se administran alrededor de 1×10^7 CAR células T a alrededor de 1×10^9 CAR células T, alrededor de 2×10^7 CAR células T a alrededor de 0.9×10^9 CAR células T, alrededor de 3×10^7 CAR células T a alrededor de 0.8×10^9 CAR células T, alrededor de 4×10^7 CAR células T a alrededor de 0.7×10^9 CAR células T, alrededor de 5×10^7 CAR células T a alrededor de 0.6×10^9 CAR células T o alrededor de 5×10^7 CAR células T a alrededor de 0.5×10^9 CAR células T al sujeto.

En una modalidad, la cantidad de células T en la composición que se administra al sujeto es de al menos 0.1×10^4 células/kg de peso corporal, al menos 0.5×10^4 células/kg de peso corporal, al menos 1×10^4 células/kg de peso corporal, al menos 5×10^4 células/kg de peso corporal, al menos 1×10^5 células/kg de peso corporal, al menos 0.5×10^6 células/kg de peso corporal, al menos 1×10^6 células/kg de peso corporal, al

menos 0.5×10^7 células/kg de peso corporal, al menos 1×10^7
 células/kg de peso corporal, al menos 0.5×10^8 células/kg de
 peso corporal, al menos 1×10^8 células/kg de peso corporal, al
 menos 2×10^8 células/kg de peso corporal, al menos 3×10^8
 5 células/kg de peso corporal, al menos 4×10^8 células/kg de
 peso corporal, al menos 5×10^8 células/kg de peso corporal o
 al menos 1×10^9 células/kg de peso corporal. En modalidades
 particulares, se administran alrededor de 1×10^6 CAR T
 células/kg de peso corporal a alrededor de 1×10^8 CAR T
 10 células/kg de peso corporal, alrededor de 2×10^6 CAR T
 células/kg de peso corporal a alrededor de 0.9×10^8 CAR T
 células/kg de peso corporal, alrededor de 3×10^6 CAR T
 células/kg de peso corporal a alrededor de 0.8×10^8 CAR T
 células/kg de peso corporal, alrededor de 4×10^6 CAR T
 15 células/kg de peso corporal a alrededor de 0.7×10^8 CAR T
 células/kg de peso corporal, alrededor de 5×10^6 CAR T
 células/kg de peso corporal a alrededor de 0.6×10^8 CAR T
 células/kg de peso corporal o alrededor de 5×10^6 CAR T
 células/kg de peso corporal a alrededor de 0.5×10^8 CAR T
 20 células/kg al sujeto.

El experto en la técnica reconocería que pueden necesitarse
 múltiples administraciones de las composiciones de la invención
 para realizar la terapia deseada. Por ejemplo, una composición

se puede administrar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más veces durante un período de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años, 10 años o más.

5

En determinadas modalidades, puede ser deseable administrar células efectoras inmunes activadas a un sujeto y posteriormente volver a extraerle sangre (o realizar una aféresis), activar las células efectoras inmunes a partir de esta de acuerdo con la presente invención y volver a administrar al paciente por infusión estas células efectoras inmunes activadas y expandidas. Este proceso se puede realizar varias veces cada pocas semanas. En determinadas modalidades, las células efectoras inmunes se pueden activar a partir de 10 extracciones de sangre de 10 cc a 400 cc. En determinadas modalidades, las células efectoras inmunes se activan a partir de extracciones de sangre de 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc, 100 cc, 150 cc, 200 cc, 250 cc, 300 cc, 350 cc o 400 cc o más. Sin deseo de limitarse a la teoría, el 15 uso de este protocolo de múltiples extracciones de sangre/múltiples reinfusiones puede servir para seleccionar determinadas poblaciones de células efectoras inmunes.

20

La administración de las composiciones contempladas en la

presente se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente incluidos inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implante o trasplante. En una modalidad preferida, las composiciones se administran por vía parenteral. Las frases

5 «administración parenteral» y «administrado/a de forma parenteral», tal como se usan en la presente, se refieren a modos de administración diferentes de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección e incluyen, de modo no taxativo, inyección e infusión intravascular, intravenosa,

10 intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intratumoral, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal e intraesternal. En una modalidad, las composiciones contempladas

15 en la presente se administran a un sujeto mediante inyección directa en un tumor, nódulo linfático o lugar de infección.

En una modalidad, un sujeto que lo necesita recibe una cantidad eficaz de una composición para aumentar una respuesta

20 inmunitaria celular a una afección relacionada con células B en el sujeto. La respuesta inmunitaria puede incluir respuestas inmunitarias celulares mediadas por células T citotóxicas que pueden destruir respuestas de células infectadas, células T reguladoras y células T auxiliares. También se pueden inducir

respuestas inmunitarias humorales, mediadas principalmente por células T auxiliares con la capacidad de activar células B y así llevar a producción de anticuerpos. Se pueden utilizar diversas técnicas para analizar el tipo de respuestas

5 inmunitarias inducidas por las composiciones de la presente invención, que se describen correctamente en la técnica, p. ej., *Current Protocols in Immunology*, editado por: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.

10

En el caso de destrucción mediada por células T, la unión del ligando a CAR inicia la señalización de CAR a la célula T, lo que produce activación de diversas vías de señalización de células T que inducen la producción o liberación de proteínas

15 por parte de las células T que pueden inducir la apoptosis de células objetivo a través de diversos mecanismos. Estos mecanismos mediados por células T incluyen (de modo no taxativo) la transferencia de gránulos citotóxicos intracelulares de la célula T a la célula objetivo, secreción

20 por parte de las células T de citocinas proinflamatorias que puedan inducir la destrucción de células objetivo de forma directa (o de forma indirecta mediante reclutamiento de otras células efectoras destructoras) y regulación en aumento de los ligandos del receptor de muerte (p. ej., FasL) en la superficie

de células T que induce apoptosis de células objetivo luego de la unión a su receptor de muerte cognado (p. ej., Fas) en la célula objetivo.

- 5 En una modalidad, la invención brinda un método para tratar a un sujeto diagnosticado con una afección relacionada con células B que comprende eliminar las células efectoras inmunes de un sujeto diagnosticado con una afección relacionada con células B con expresión de BCMA, modificar genéticamente dichas
- 10 células efectoras inmunes con un vector que comprenda un ácido nucleico que codifique un CAR como se contempla en la presente, con lo cual se produce una población de células efectoras inmunes modificadas y administrarle la población de células efectoras inmunes modificadas al mismo sujeto. En una modalidad
- 15 preferida, las células efectoras inmunes comprenden células T.

En determinadas modalidades, la presente invención también brinda métodos para estimular una respuesta inmunitaria del modulador mediada por células efectoras inmunes a una población

20 de células objetivo en un sujeto que comprenden las etapas de administrarle al sujeto una población de células efectoras inmunes que expresen una construcción de ácido nucleico que codifique una molécula de CAR.

Los métodos para administración de las composiciones celulares descritas en la presente incluyen cualquier método eficaz para producir la reintroducción de células efectoras inmunes genéticamente modificadas *ex vivo* que expresan directamente un
5 CAR de la invención en el sujeto o tras reintroducción de los progenitores genéticamente modificados de células efectoras inmunes que al introducirse a un sujeto se diferencian en células efectoras inmunes maduras que expresan el CAR. Un método comprende transducción de células T de sangre periférica
10 *ex vivo* con una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la invención y retorno de las células transducidas al sujeto.

Todas las publicaciones, solicitudes de patente y patentes emitidas citadas en la presente memoria descriptiva se
15 incorporan a la presente mediante esta referencia como si cada publicación, solicitud de patente o patente emitida individual se indicara específica e individualmente como incorporada mediante esta referencia.

20 Si bien la invención que antecede se describió con cierto de detalle a modo ilustrativo y de ejemplo a los efectos de lograr claridad en la comprensión, será fácilmente evidente para los expertos en la técnica en virtud de las indicaciones de la presente invención que podrán realizarse determinados cambios y

modificaciones en esta sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo ilustrativo y no taxativo. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente diversos parámetros no
 5 fundamentales que podrían cambiarse o modificarse para producir resultados esencialmente similares.

EJEMPLOS

10

EJEMPLO 1

CONSTRUCCIÓN DE CAR DE BCMA

Se diseñaron CAR con anticuerpos scFv anti-BCMA de murino para contener un promotor de MND enlazado de forma operativa a scFv anti-BCMA, un dominio bisagra y transmembrana de CD8 α
 15 un dominio coestimulador CD137, seguido por el dominio de señalización intracelular de la cadena CD3 ζ . Remitirse, p. ej., a la figura 1. El CAR de BCMA que se muestra en la figura 1 comprende una secuencia del péptido señal (SP, por su sigla en inglés) CD8 α para expresión superficial en
 20 células efectoras inmunes. La secuencia de polinucleótidos de un ejemplo de CAR de BCMA se indica en la SEQ ID NO: 10, un ejemplo de secuencias de polipéptidos de un CAR de BCMA se indica en la SEQ ID NO: 9 y un mapa vectorial de un ejemplo de construcción de CAR se muestra en la figura 1. La tabla 3

muestra la identidad, la referencia Genbank, el nombre de origen y la mención para diversos segmentos de nucleótidos de un vector lentiviral de CAR de BCMA.

5 Tabla 3

	Nucleóti dos	Identidad	Referencia GenBank	Nombre de origen	Mención
10	1-185	Estructura principal de plásmido pUC19	Registro n.º L09137.2 nt 1 - 185	pUC19	New England Biolabs
	185-222	Enlazador	No corresponde	Sintético	No corresponde
	223-800	CMV	No corresponde	pHCMV	(1994) PNAS 91: 9564-68
15	801-1136	R, U5, PBS y secuencias de envoltura	Registro n.º M19921.2 nt 454-789	pNL4-3	Maldarelli, et.ál. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
	1137-1139	Codón de inicio gag (ATG) cambiado a codón de detención (TAG)	No corresponde	Sintético	No corresponde
20	1140-1240	Secuencia gag de HIV-1	Registro n.º M19921.2 nt 793-893	pNL4-3	Maldarelli, et.ál. (1991) J Virol: 65(11):5732-43

5	1241-1243	Secuencia gag de HIV-1 cambiada a un segundo codón de detención	No corresponde	Sintético	No corresponde
	1244-1595	Secuencia gag de HIV-1	Registro n.º M19921.2 nt 897-1248	pNL4-3	Maldarelli, et.ál. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
10	1596-1992	HIV-1 pol cPPT/CTS	Registro n.º M19921.2 nt 4745-5125	pNL4-3	Maldarelli, et.ál. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
	1993-2517	HIV-1, región env HXB3 aislada (RRE)	Registro n.º M14100.1 nt 1875-2399	PgTAT-CMV	Malim, M. H. Nature (1988) 335:181-183
15	2518-2693	Secuencia env de HIV-1 S/A	Registro n.º M19921.2 nt 8290-8470	pNL4-3	Maldarelli, et.ál. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
	2694-2708	Enlazador	No corresponde	Sintético	No corresponde
20	2709-3096	MND	No corresponde	pccl-c-MNDU3c-x2	Challita et ál. (1995) J.Virol. 69: 748-755

5	3097-3124	Enlazador	No corresponde	Sintético	No corresponde
	3125-3187	Péptido señal	Registro n.º NM_001768	Péptido señal de CD8a	No corresponde
	3188-3934	BCMA02 scFv (V _L 1-enlazador-V _H 0)	No corresponde	Sintético	No corresponde
10	3935-4141	TM y bisagra CD8a	Registro n.º NM_001768	TM y bisagra CD8a	Milone et ál (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
	4144-4269	Dominio de señalización CD137 (4-1BB)	Registro n.º NM_001561	Dominio de señalización CD137	Milone et ál (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
15	4270-4606	Dominio de señalización CD3-ζ	Registro n.º NM_000734	Dominio de señalización CD3-ζ	Milone et ál (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
	4607-4717	ppt de HIV-1 y parte de U3 3'	Registro n.º M19921.2 nt 9005-9110	pNL4-3	Maldarelli, et.ál. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
20	4718-4834	HIV-1 parte de U3 (eliminación de 399 pb) y R	Registro n.º M19921.2 nt 9511-9627	pNL4-3	Maldarelli, et.ál. (1991) J Virol: 65(11):5732-43

5

4835- 4858	poliA sintética	No corresponde	Sintético	Levitt, N. Genes & Dev (1989) 3:1019-1025
4859- 4877	Enlazador	No corresponde	Sintético	No corresponde
4878- 7350	Estructura principal de pUC19	Registro n.º L09137.2 nt 2636-2686	pUC19	New England Biolabs

10

EJEMPLO 2

EVALUACIÓN DE UN CAR DE BCMA DE MURINO

Introducción

La transferencia adoptiva de células T genéticamente modificadas con receptores de antígeno quimérico (CAR) ha surgido como un enfoque prometedor para tratar los cánceres. Un CAR es una molécula artificial compuesta por un fragmento variable de cadena simple (scFv, por su sigla en inglés) que reacciona con el antígeno, fusionado a dominios de señalización de células T mediante una región transmembrana. En este ejemplo, se evaluó una molécula de CAR específica para el antígeno de maduración de células B (BCMA). El BCMA se expresa en mieloma múltiple, plasmacitoma y algunos linfomas, aunque la expresión normal se limita a células plasmáticas (Avery et ál., 2003; Carpenito et ál., 2009; Chiu

et ál., 2007).

El CAR anti-BCMA02 se construyó utilizando secuencias de un anticuerpo anti-BCMA de ratón (C11D5.3). El CAR anti-BCMA10
5 se construyó utilizando secuencias modificadas y es una versión «humanizada» del CAR anti-BCMA02. En una serie de ensayos *in vitro*, tanto las células T de CAR anti-BCMA02 como las células T de CAR anti-BCMA10 presentaron especificidad tumoral, expresión de CAR elevada y provocaron una
10 reactividad potente con respecto a objetivos de expresión de antígeno. Las células T de CAR anti-BCMA02 y las células T de CAR anti-BCMA10 demostraron tener reactividad comparable con las líneas celulares tumorales con expresión de BCMA. Si bien tanto las células T de CAR anti-BCMA02 como las células T de
15 CAR anti-BCMA10 fueron capaces de provocar regresiones en un modelo tumoral de ratón, las células T de CAR anti-BCMA10 presentaron secreción de citocinas inflamatorias independiente del antígeno y, por lo tanto, tienen el potencial de provocar toxicidades clínicas asociadas con
20 niveles elevados de citocinas.

Resultados

Liberación tónica de citocinas inflamatorias a partir de células T anti-BCMA10 asociadas con la apoptosis

La proteína de BCMA se puede detectar en el suero de pacientes con mieloma múltiple (Sanchez *et ál.*, 2012). El BCMA sérico promedio en pacientes con mieloma múltiple fue de 10 ng/mL, pero alcanzó un pico de niveles de hasta 100 ng/mL.

5 Se evaluó el impacto de los niveles fisiológicos de BCMA soluble en los candidatos de células T de CAR anti-BCMA.

Se examinó la liberación de IFN γ de células T de CAR anti-BCMA02, células T de CAR anti-BCMA10 y células T de CAR19 Δ 10 luego de un cultivo de 24 horas con BCMA soluble (figura 2a). Las células T de CAR anti-BCMA02 respondieron con liberación mínima de citocinas luego de un cultivo de 24 horas con hasta 1 ug/mL de BCMA. Por el contrario, las células T de CAR anti-BCMA10 respondieron con mayores niveles de IFN γ que fueron 15 proporcionales a la concentración de BCMA soluble que se agregó al cultivo. A 100 ng/mL de BCMA, los niveles máximos indicados en pacientes con mieloma múltiple, las células T de CAR anti-BCMA10 secretaron 82.1 ng/ml de IFN γ , en comparación con 28.8 ng/ml de IFN γ secretados por las células T de CAR 20 anti-BCMA02. El IFN γ se detectó incluso en diversos experimentos de cultivo conjunto con células T de CAR anti-BCMA10 más líneas celulares de control que carecían de antígeno BCMA (figura 2b, cultivo conjunto K562). Estos datos sugirieron que las células T de CAR anti-BCMA10 tenían una

mayor sensibilidad a la estimulación con BCMA soluble y el potencial de respuestas de citocina independientes del antígeno en células T.

5 Se examinó el potencial de secreción tónica de citocinas de células T de CAR anti-BCMA02, células T de CAR anti-BCMA10 (10 días después del inicio del cultivo) y células T de CAR19Δ. Luego de fabricar células T de CAR, se analizaron medios de cultivo de célula T de CAR anti-BCMA02, célula T de
10 CAR anti-BCMA10 y célula T de CAR19Δ para determinar la presencia de citocinas inflamatorias. Pese a la ausencia de estimulación antigénica, los cultivos de células T de CAR anti-BCMA10 contenían más de 10 ng/mL de IFN γ en comparación con menos de 1 ng/mL de IFN γ en los cultivos de células T de
15 CAR anti-BCMA02 (figura 3). Los cultivos de células T de CAR anti-BCMA10 también contenían considerablemente ($p < 0.001$) más TNF α . Para cuantificar adicionalmente la cantidad de citocina producida por las células T de CAR anti-BCMA10 sin estimulación antigénica, se midió la liberación de citocina a
20 partir de 5×10^4 células T de CAR durante un cultivo de 24 horas. Las células T de CAR anti-BCMA10 produjeron cantidades considerablemente mayores de citocinas inflamatorias MIP1 α , IFN γ , GMCSF, MIP1 β , IL-8 y TNF α en comparación con las células T de CAR anti-BCMA02 (figura 4, $p < 0.0001$). Las

concentraciones de MIP1 α e IFN γ fueron las mayores entre todas las citocinas examinadas. Las células T de CAR anti-BCMA10 produjeron 4.7 ng de MIP1 α /5 x 10⁴ células/24 horas, 3.0 ng IFN γ /5 x 10⁴ células/24 horas y ~1ng/5 x 10⁴ células/24
5 horas o menos de las otras citocinas. No se detectaron diferencias considerables en las citocinas antiinflamatorias IL-10, IL-2 e IL-4.

Se midió la expresión de marcadores fenotípicos de activación
10 de células T al final de la elaboración de células T de CAR anti-BCMA10 para examinar si la secreción tónica de citocinas inflamatorias indicaba un estado hiperactivo en las células T de CAR anti-BCMA10. HLA-DR y CD25 son marcadores de superficie que normalmente presentan una expresión pico 12-24
15 horas después de la activación de células T y luego disminuyen con el tiempo. Las células T de CAR preparadas a partir de tres donantes normales mostraron que un promedio de 40 $\pm$ 2 % de células T de CAR anti-BCMA02 presentaba HLA-DR. La expresión de HLA-DR en estas células fue comparable a células
20 T sin transducción (43 $\pm$ 2.3 %) y células T de control CAR19 Δ (32 $\pm$ 2.2 %). Por el contrario, 88 $\pm$ 1.2 % de las células T de CAR anti-BCMA10 expresó HLA-DR (figura 5). La expresión de otro marcador de activación CD25 también fue mayor en las células T de CAR anti-BCMA10 en comparación con las células T

de CAR anti-BCMA02 (53 ± 0.9 % contra 35 ± 2.4 %). Por lo tanto, las células T de CAR anti-BCMA10 presentaron características fenotípicas de células T activadas sin antígenos agregados.

- 5 La hiperactividad en las células T a menudo se asocia con muerte celular inducida por activación (AICD, por su sigla en inglés) mediante apoptosis. Se midieron los niveles de caspasa 3 activada para examinar si la hiperactividad de las células T de CAR anti-BCMA10 podría producir mayores niveles
- 10 apoptóticos en comparación las células T de CAR anti-BCMA02. El 48 % de las células T de CAR anti-BCMA10 de dos donantes tuvo caspasa-3 activa, en comparación con el 16 % de las células T de CAR anti-BCMA02 (figura 6). Por lo tanto, sin antígeno BCMA agregado, las células T de CAR anti-BCMA10
- 15 contenían una mayor frecuencia de células apoptóticas asociada con mayor activación y secreción de citocinas inflamatorias en comparación con las células T de CAR anti-BCMA02.
- 20 Las células T de CAR anti-BCMA02 y las células T de CAR anti-BCMA10 se evaluaron para determinar si las células T de CAR podrían responder de forma selectiva a niveles bajos de BCMA o podrían tener reactividad cruzada con un antígeno no relacionado en el suero humano utilizado para cultivo de

células T. Las células T de CAR anti-BCMA02 y las células T de CAR anti-BCMA10 se mantuvieron en medio sin suero humano durante dos días y luego se cambiaron a medio con suero bovino fetal (FBS), suero humano (HABS) o HABS con o sin 100 ng/mL de BCMA soluble (figura 7). Se analizó la liberación de IFN γ 24 horas después mediante ELISA. Tanto las células T de CAR anti-BCMA02 como las células T de CAR anti-BCMA10 respondieron al BCMA soluble. No obstante, las células T de CAR anti-BCMA10 secretaron 10 veces más IFN γ que las células T de CAR anti-BCMA02. En ausencia de BCMA, solamente las células T de CAR anti-BCMA10 liberaron IFN γ , independientemente del cultivo en suero bovino fetal (FBS) ($p=0.0002$) o suero AB humano (HABS) ($p=0.0007$). Estos datos sugirieron que la secreción de citocinas inflamatorias era intrínseca de las células T de CAR anti-BCMA10.

Función antitumoral inferior de células T de CAR anti-BCMA10 en un modelo de mieloma múltiple de ratón

La hiperactivación y la mayor apoptosis podrían tener un impacto negativo en la persistencia de células T de CAR en los pacientes y, en última instancia, en la eficacia clínica. Se examinó la función antitumoral de células T de CAR anti-BCMA02 y células T de CAR anti-BCMA10 en un modelo de tumor en ratón. Se trataron ratones NOD *scid* gamma (NSG) con

tumores de $\sim 100 \text{ mm}^3$ e mieloma múltiple humano subcutáneo experimental de (RPMI-8226) con 10^7 células T de CAR02 anti-BCMA, 10^7 células T de CAR anti-BCMA10 o Bortezomib (velcade). El crecimiento de RPMI-8226 se supervisó con
5 calibradores. En dos experimentos independientes (figuras 8a y 8b), se comparó el crecimiento tumoral controlado con Bortezomib con los animales con control de vehículo. Los animales con transferencia adoptiva con células T de CAR anti-BCMA02 presentaron una depuración tumoral rápida y
10 duradera (las gráficas insertadas aumentan las regresiones tumorales tempranas). La transferencia adoptiva de células T de CAR anti-BCMA10 también provocó regresiones tumorales, pero se retrasó en ambos experimentos en comparación con las células T de CAR anti-BCMA02.

15

Conclusiones

Las células T de CAR anti-BCMA02 y las células T de CAR anti-BCMA10 presentaron función antitumoral comparable en ensayos in vitro, pero las células T de CAR anti-BCMA10 tuvieron
20 características que podrían tener un impacto negativo en la seguridad y eficacia en el tratamiento de los pacientes. Las células T de CAR anti-BCMA10 respondieron de forma potente con secreción de citocinas inflamatorias luego de exposición a niveles fisiológicos de proteína de BCMA. La tormenta de

citocinas o el síndrome de liberación de citocinas es una toxicidad clínica conocida asociada con terapias con células T de CAR. Las preocupaciones con respecto a la liberación de citocinas en BCMA empeoraron luego de la observación de actividad tónica de células T de CAR anti-BCMA10. Incluso en ausencia de estimulación del antígeno, las células T de CAR anti-BCMA10 liberaron niveles elevados de citocinas inflamatorias. La secreción persistente de citocinas tiene el potencial de provocar toxicidades clínicas sustanciales, así como tener un impacto negativo en la función antitumoral. Efectivamente, se descubrió una mayor composición de células apoptóticas y una función antitumoral inferior en células T de CAR anti-BCMA10 en comparación con cultivos de células T de CAR anti-BCMA02 en un modelo de mieloma múltiple de ratón.

15

Referencias

- Avery et ál., (2003). *BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. J Clin Invest*, 112(2), 286-297.
- 20 Carpenito et ál., (2009). *Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. Proc Natl Acad Sci EUA*, 106(9), 3360-3365.
- Chiu et ál., (2007). *Hodgkin lymphoma cells express TACI and*

BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. Blood, 109(2), 729-739.

Sanchez et ál. (2012). *Serum B-cell maturation antigen is elevated in multiple myeloma and correlates with disease status and survival. Br J Haematol, 158(6), 727-738.*

EJEMPLO 3

LA EXPRESIÓN MÍNIMA DE BCMA EN LINFOMAS ACTIVA LAS CÉLULAS T DE CAR ANTI-BCMA

Se midió el nivel de expresión de BCMA en líneas celulares de linfoma y leucemia (Daudi y Raji) para determinar si la expresión era suficiente para activar las células T de CAR anti-BCMA02.

Se cuantificó la expresión de BCMA en células de linfoma, leucemia y mieloma múltiple utilizando citometría de flujo. En este ensayo, se analizó la expresión de BCMA relativa en las células mediante correlación de la intensidad de fluorescencia de la expresión de BCMA con una cantidad conocida de anticuerpos enlazados (capacidad de unión al anticuerpo, ABC, por su sigla en inglés). Los niveles de expresión de BCMA en las líneas de células de linfoma se compararon con los niveles de expresión de BCMA de una línea

celular de mieloma múltiple (RPMI-8226) que se sabe que activa las células T de CAR anti-BCMA02. Se expresaron 12590±1275 moléculas de BCMA02 en la superficie de células RPMI-8226. Por el contrario, las células de Daudi expresaron 5 1173±234 moléculas de BCMA02 y las células JeKo-1 (una línea celular de linfoma de células del manto) expresaron solamente 222±138 moléculas de BCMA02 (figura 9, círculos).

En otro conjunto de experimentos, se analizó la actividad de 10 células T de CAR anti-BCMA02 con respecto a los niveles diminutos de BCMA observados en líneas celulares de linfoma y leucemia (figura 9, recuadros). Se generaron células T de CAR anti-BCMA02 utilizando métodos estándar y la actividad se evaluó mediante ELISA de IFN γ luego del cultivo conjunto con 15 líneas celulares tumorales positivas para BCMA y negativas para BCMA. La reactividad de las células T de CAR anti-BCMA02 tuvo correlación con la cantidad relativa de expresión de ARNm de BCMA (por encima de un umbral) y/o la densidad del receptor de BCMA en la superficie de diversas líneas 20 celulares tumorales luego del cultivo conjunto (figura 9). La liberación de IFN γ fue escasa, si no nula, luego del cultivo conjunto de células T de CAR de BCMA con líneas celulares tumorales negativas para BCMA (BCMA-): leucemia mielógena (K562), leucemia linfoblástica aguda (NALM-6 y NALM-16),

linfoma de células del manto (REC-1) o linfoma de Hodgkin (HDLM-2). Por el contrario, se liberaron cantidades sustanciales de IFN γ luego del cultivo conjunto de células T de CAR de BCMA02 con líneas celulares tumorales positivas para BCMA (BCMA+): leucemia linfoblástica crónica de células B (MEC-1), linfoma de células del manto (JeKo-1), linfoma de Hodgkin (RPMI-6666), linfoma de Burkitt (células de Daudi y células de Ramos) y mieloma múltiple (RPMI-8226).

La reactividad de las células T de CAR anti-BCMA02 con respecto a células de linfoma de Burkitt con expresión de BCMA (células de Daudi) se extendió a estudios animales *in vivo*. Las células de Daudi también expresan CD19. La actividad *in vivo* de células T de CAR anti-BCMA02 se comparó con la actividad *in vivo* de células T de CAR anti-CD19. Ratones NOD scid gamma (NSG) recibieron inyecciones IV con 2×10^6 células de Daudi y se dejó que acumularan una gran carga tumoral sistémica antes de tratarse con células T de CAR. Las células T de CAR se administraron 8 días y 18 días después de la inducción tumoral (figuras 10A y 10B, respectivamente). El vehículo y el control negativo (células T de CAR anti-CD19 Δ) no lograron evitar el crecimiento tumoral, como se observa mediante aumentos de fase logarítmica en la bioluminiscencia, lo cual produjo pérdida

de peso y muerte (figura 10A, dos paneles de ratón más hacia la izquierda). Las células T de CAR anti-CD19 y anti-BCMA02 evitaron el crecimiento tumoral, lo que produjo mantenimiento del peso corporal y supervivencia. Las células T de CAR anti-CD19 y anti-BCMA02 fueron igualmente eficaces al administrarse en el día 8 (figura 10A, dos paneles ratones más hacia la derecha). Las células T de CAR anti-BCMA02 también fueron eficaces en la disminución de la carga tumoral al administrarse a los 18 días de la inducción tumoral. Figura 10B, panel más hacia la derecha.

EJEMPLO 4

ACTIVIDAD *IN VITRO* POTENTE DE CÉLULAS T DE CAR ANTI-BCMA

Se logró actividad potente *in vitro* de células T de CAR anti-BCMA02 con una reducción del 50 por ciento en la expresión de CAR anti-BCMA02. Las poblaciones de células T se transdujeron con entre 4×10^8 y 5×10^7 unidades de transducción de un lentivirus con codificación de una molécula de CAR anti-BCMA02. Las poblaciones de células T resultantes mostraron menor frecuencia de células T de CAR anti-BCMA02 (analizadas como porcentaje positivo) y menor expresión de moléculas de CAR anti-BCMA02 (analizadas como intensidad de fluorescencia media: MFI, por su sigla en inglés).

Se determinó el impacto de una menor expresión de la molécula de CAR en la actividad anti-BCMA02. La frecuencia de células T positivas para CAR anti-BCMA se normalizó con células T sin transducción para contener 26 ± 4 % de células T con reacción a BCMA (figura 11A). La MFI de las células T de CAR anti-BCMA02 normalizadas osciló entre 885 y 1875 (figura 11B). K562 es una línea celular de CML que carece de expresión de BCMA. Las células K562 se modificaron para expresar BCMA y se utilizaron en un ensayo citolítico in vitro para evaluar la actividad de células T de CAR anti-BCMA02 con expresión variada de CAR de BCMA (figura 11C). Las células K562 se etiquetaron con traza celular violeta, mientras que las células K562 con expresión estable de BCMA (K562-BCMA) se etiquetaron con CFSE. Las células T, células K562 y células K562-BCMA se extrajeron, se lavaron y se volvieron a suspender en medio sin citocinas exógenas. Las células se cultivaron a una relación 20:1 o 10:1 de efector (E, célula T) a objetivo (T, mezcla 1:1 de células K562 y K562 BCMA) durante 4 h en una incubadora a 37 °C con CO₂ al 5 %. Las células luego se tiñeron con vida/muerte y se analizaron mediante un FACS. La citotoxicidad se determinó según la diferencia en la relación de células K562:K562-BCMA normalizada para condiciones sin células T.

EJEMPLO 5

PROCESO DE ELABORACIÓN DE CÉLULAS T DE CAR ANTI-BCMA

Se elaboran productos de células T de CAR anti-BCMA02 exclusivos para cada tratamiento de paciente. La
5 confiabilidad del proceso de elaboración de productos de células T de CAR anti-BCMA02 se evaluó generando células T de CAR anti-BCMA02 a partir de 11 PBMC de donantes normales individuales. La expansión de las células T de CAR anti-BCMA02 de cada donante fue comparable a un cultivo sin
10 transducción emparejado realizado en paralelo (figura 12A).

Al final del período de cultivo (día 10), se evaluó la eficacia de la transducción de células T cuantificando la cantidad de lentivirus integrados con qPCR y conjuntos de
15 cebadores específicos lentivirales (cantidad de copias de vector, VCN, por su sigla en inglés). Los cultivos de células T de CAR anti-BCMA02 de 11 donantes mostraron eficacia de transducción lentiviral comparable (figura 12B). La frecuencia de las células T positivas para CAR anti-BCMA02 se
20 midió con citometría de flujo y se descubrió que la expresión de BCMA era comparable en todos los donantes (figura 12C).

Se evaluó la actividad de cada producto de célula T de CAR anti-BCMA02 mediante liberación de IFN γ luego del cultivo

conjunto con células K562 modificadas para expresar BCMA. Todos los productos de células T de CAR02 anti-BCMA presentaron niveles terapéuticamente relevantes de liberación de IFN γ al exponerse a células K562 con expresión de BCMA
 5 (figura 12D).

EJEMPLO 6

EXPRESIÓN DE CD62L, CD127, CD197 Y CD38 EN CÉLULAS T DE CAR TRATADAS
 CON IL-2 o IL-2 Y ZSTK474

10 Las células T de CAR cultivadas con IL-2 y ZSTK474 mostraron mayor expresión de CD62L en comparación con las células T de CAR cultivadas solo con IL-2. Se realizó un análisis de expresión de 29 marcadores de superficie celular adicionales en células T de CAR anti-BCMA02 cultivadas con IL-2 y ZSTK474
 15 utilizando citometría de masa de parámetros múltiples (CyTOF) y comparación con las células T de CAR cultivadas solo en IL-2. Tres marcadores adicionales (CD127, CD197 y CD38) mostraron mayor expresión en las células T de CAR tratadas con IL-2 + ZSTK474 en comparación con las células T de CAR
 20 tratadas solo con IL-2. Por lo tanto, la expresión conjunta de CD62L, CD127, CD197 y CD38 estratificó adicionalmente las células T de CAR cultivadas con ZSTK474. Luego del cultivo en medio con IL-2, 7.44 % de las T de CAR anti-BCMA02 expresó de forma conjunta CD127, CD197 y CD38 en comparación con 24.5 %

de las células T de CAR anti-BCMA02 cultivadas con IL-2 y ZSTK474. El diagrama de Venn en la figura 13 ilustra la expresión conjunta de CD127, CD197 y CD38 en células T anti-BCMA02 positivas para CD62L.

5

EJEMPLO 7

EL TRATAMIENTO CON ZSTK474 AUMENTA LA FRECUENCIA DE LAS CÉLULAS T DE CD8

Se cuantificó la expresión de CD8 en células T de CAR anti-BCMA02 tratadas solo con IL-2 o IL-2 y ZSTK474. La expresión

10 de CD8 se determinó utilizando un anticuerpo anti-CD8 etiquetado de forma fluorescente y citometría de flujo. Las células T de CAR anti-BCMA02 de siete donantes normales cultivadas con IL-2 y ZSTK474 tuvieron una expresión significativamente mayor de CD8 en comparación con las

15 células T de CAR anti-BCMA02 cultivadas solo con IL-2. Figura 14.

EJEMPLO 8

FALTA DE ACTIVIDAD INDEPENDIENTE DEL ANTÍGENO EN CÉLULAS T DE CAR ANTI-BCMA TRATADAS CON ZSTK474

20

La actividad tónica de las células T de CAR sin antígeno se ha asociado con una menor actividad biológica. La actividad tónica de las células T de CAR anti-BCMA02 se evaluó cuantificando la liberación de interferón- γ (IFN- γ) sin

antígeno, luego de cultivo en presencia de IL-2 y ZSTK474, en comparación con condiciones de cultivo estándares solo con IL-2. Los cultivos de células T de CAR anti-BCMA se prepararon utilizando un sistema directamente aumentable para
5 procesos de fabricación clínica de entidad. En resumen, se cultivaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en matraces estáticos en medio con IL-2 (CellGenix) y anticuerpos específicos para CD3 y CD28 (Miltenyi Biotec). Se agregaron 2×10^8 unidades de transducción de lentivirus que
10 codifica CAR anti-BCMA un día después del inicio del cultivo.

Las células T de CAR anti-BCMA02 se mantuvieron en fase logarítmica agregando medio fresco con IL-2 y una dosis optimizada de ZSTK474 para un total de diez días de cultivo.
15 Al final del período de elaboración, se volvió a cultivar una cantidad equivalente de células T de CAR anti-BCMA02 durante 24 horas solamente en medio. La cantidad de IFN- γ liberado en 24 horas se cuantificó mediante ELISA. En este ensayo, los niveles de IFN- γ por debajo de 200 pg/mL no representan
20 actividad tónica. La figura 15 muestra que la cantidad de IFN- γ liberado por las células T de CAR anti-BCMA02 de 14 donantes es coherente con la falta de actividad tónica, independientemente de que las células T de CAR se cultiven o no con ZSTK474.

EJEMPLO 9

LAS CÉLULAS T DE CAR ANTI-BCMA02 TRATADAS CON ZSTK474 MUESTRAN ACTIVIDAD
TERAPÉUTICA EN UN MODELO TUMORAL DE LINFOMA

5 Se utilizaron tumores de Daudi para cuestionar la actividad antitumoral de las células T de CAR anti-BCMA02 cultivadas con IL-2 o IL-2 y ZSTK474. Las células de Daudi expresan un nivel bajo de proteína de BCMA y brindan un modelo tumoral de linfoma agresivo y difícil de tratar.

10

Se etiquetaron 2×10^6 células tumorales de Daudi con un gen de luciferasa de luciérnaga y se inyectaron en ratones NOD scid con silenciamiento de cadena gamma del receptor de IL-2 (NSG) mediante inyección intravenosa. Luego de permitir la
15 formación de los tumores, se inyectaron 1×10^7 células T de CAR en los ratones con tumor. Los ratones recibieron inyecciones de i) células T de CAR anti-BCMA02 tratadas durante diez días con IL-2 o IL-2 y ZSTK474 o ii) una célula T de CAR anti-BCMA02 deficiente para señalización trunca
20 (tBCMA02) tratada durante diez días con IL-2 y ZSTK474. Se supervisó el crecimiento tumoral mediante bioluminiscencia utilizando un sistema de imagenología Xenogen-IVIS.

Se observó regresión completa del tumor en el 50 % de los

ratones que recibieron las células T de CAR anti-BCMA02 tratadas con IL-2 y ZSTK474. Figura 16.

EJEMPLO 10

- 5 LAS CÉLULAS T DE CAR TRATADAS CON ZSTK474 MOSTRARON ACTIVIDAD TERAPÉUTICA
EN UN MODELO DE RATÓN DE MIELOMA HUMANO

Animales con tumores de mieloma múltiple subcutáneos de 100 mm³ (RPMI-8226) recibieron infusiones de dosis equivalentes de células T de CAR (1x10⁶ células T positivas para CAR anti-BCMA02) o células T sin modificar de un donante de células T en correspondencia (sin transducción). Las células T de CAR anti-BCMA se trataron con IL-2 o IL-2 y ZSTK474 como se describió en el ejemplo 8.

- 15 Los animales tratados con células T de CAR anti-BCMA02 cultivadas con IL-2 o IL-2 y ZSTK474 evitaron por completo el sobrecrecimiento tumoral. Figura 17. Por el contrario, los animales tratados con ausencia de transducción o vehículo no pudieron controlar el crecimiento tumoral. Figura 17.

20

En general, en las siguientes reivindicaciones, los términos usados no deberían ser interpretados como limitantes de las reivindicaciones a las modalidades específicamente descritas en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, sino que

debería entenderse que incluyen todas las modalidades posibles con el alcance total de equivalentes a los que tienen derecho tales reivindicaciones. Por consiguiente, las reivindicaciones no se ven limitadas por la descripción.

REIVINDICACIONES

1. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9.
2. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9.
3. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9.
4. Un polinucleótido que codifica un CAR, en donde la secuencia de polinucleótidos se expone en la SEQ ID NO: 10.
5. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 4, en donde el vector es un vector de expresión, un vector episomal, un vector viral, un vector retroviral, o un vector lentiviral.
6. El vector de la reivindicación 5, en donde el vector es un vector lentiviral seleccionado del grupo que consiste esencialmente en: virus de inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1), virus de inmunodeficiencia humana 2 (HIV-2), virus de visna-maedi (VMV), virus de artritis-encefalitis caprina (CAEV), virus de anemia infecciosa equina (EIAV), virus de inmunodeficiencia felina (FIV), virus de inmunodeficiencia bovina (BIV) y virus de inmunodeficiencia simia (SIV).
7. El vector de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende una LTR retroviral izquierda (5'), una señal de envoltura Psi (Ψ), una extensión central de polipurina/flap de ADN (cPPT/FLAP), un elemento de exportación retroviral, un promotor enlazado de forma operativa al polinucleótido de la reivindicación 4, y una LTR retroviral derecha (3').
8. El vector de la reivindicación 7, en donde el promotor de la 5' LTR se reemplaza con un promotor heterólogo, en donde el promotor heterólogo es un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor del virus de sarcoma de Rous (RSV) o un promotor del virus de simio 40 (SV40).

9. El vector de la reivindicación 7, en donde la 3' LTR comprende una LTR de autoinactivación (SIN).
10. Una célula efectora inmune que comprende el vector de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9.
11. La célula efectora inmune de la reivindicación 10, en donde la célula efectora inmune se selecciona del grupo que consiste en: un linfocito T y una célula citolítica natural (NK).
12. Una composición que comprende la célula efectora inmune de la reivindicación 10 o la reivindicación 11 y un excipiente fisiológicamente aceptable.
13. Un método para generar una célula CAR T que comprende transducir la célula efectora inmune con un vector lentiviral que codifica un CAR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9.

P-13682

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **NC2017/0006808**
Solicitud de patente a nombre de **BLUEBIRD BIO INC.**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, piso 3, obrando como apoderada de la sociedad BLUEBIRD BIO INC., domiciliada en Estados Unidos de América, Solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. **373** notificado electrónicamente el 01 de marzo de 2019, atentamente me permito informar que, con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al Solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, se realizan las siguientes modificaciones:

1. Reivindicaciones

En relación con las objeciones sobre la falta de claridad de las reivindicaciones, presento junto con este memorial un nuevo capítulo reivindicatorio, el cual consta de trece (13) reivindicaciones, y que reemplaza completamente el presentado anteriormente. Específicamente, se realizaron las siguientes modificaciones:

- 1.1 No se incluyen las antiguas reivindicaciones 4 y 7.
- 1.2 Se combinaron las antiguas reivindicaciones 6 y 7.
- 1.3 Se modificó la antigua reivindicación 10.
- 1.4 Se modificó la antigua reivindicación 15.

En cuanto a estas modificaciones, me permito decir que las mismas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud y se realizaron con el ánimo de superar las objeciones de claridad planteadas por el Examinador en su concepto técnico.

2. Pago de tasas

Considerando que el presente memorial se presenta junto con modificaciones a las reivindicaciones se adjunta recibo por concepto de examen de patentabilidad, según lo establecido en la Resolución 3719 de 2016.

En relación con el número de reivindicaciones, atentamente nos permitimos decir que no se adjunta tasa por concepto de reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo capítulo reivindicatorio tiene menor número de reivindicaciones que el presentado anteriormente, y en esencia es el mismo objeto, pero definido con mayor claridad.

3. Claridad de la solicitud

El Solicitante manifiesta que mediante la presentación del nuevo capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones, de modo tal que las nuevas reivindicaciones proporcionan claridad y concisión a la invención descrita, siguiendo las recomendaciones realizadas por el Examinador en su concepto técnico.

- 3.1 Como primera medida se informa que no se incluyen las antiguas reivindicaciones 4 y 7.
- 3.2 El Examinador también ha indicado que “[l]a reivindicación 6 no es clara porque menciona “Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 4 o la reivindicación 5”, lo cual no define el estructuralmente vector reclamado ni las características del mismo. Se sugiere caracterizar el vector por la estructura o clase”. En dicho respecto, el Solicitante manifiesta que, sin estar de acuerdo con la objeción realizada, la antigua reivindicación 6 se ha modificado para recitar en la que el vector es un vector de expresión, un vector episomal, un vector viral, un vector retroviral o un vector lentiviral. Para ello, se combinaron las antiguas reivindicaciones 6 y 7. El Solicitante sostiene que la antigua reivindicación 6 es clara porque la persona experta entendería las medidas y los límites de los vectores reivindicados actualmente. Por lo tanto, la reconsideración y el retiro de esta objeción se solicita respetuosamente.
- 3.3 En relación con la antigua reivindicación 10, el Examinador ha indicado que “no es concisa porque no permite definir con certeza el tipo de promotor heterólogo, por lo que las reivindicaciones abarcan una cantidad de posibilidades aún no exploradas por el solicitante. Se sugiere definir el tipo de promotor heterólogo”. En dicho respecto, aunque el Solicitante respetuosamente no está de acuerdo, dicha reivindicación se modificó para recitar “en donde el promotor heterólogo es un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor del virus de sarcoma de Rous (RSV) o un promotor del virus de simio 40 (SV40)”.

El Solicitante sostiene que la reivindicación 10 es clara porque el experto en la materia entendería las medidas y los límites de los promotores heterólogos actualmente reivindicados. Por lo tanto, la reconsideración y el retiro de esta objeción se solicita respetuosamente.

3.4 El Examinador señaló que el método reclamado en la antigua reivindicación 15 *“no lo caracteriza mediante una secuencia lógica de etapas y condiciones técnicas específicas en que se llevan a cabo. Se sugiere definir el método indicando la secuencia de etapas y condiciones técnicas en que ocurren, incluyendo materiales y reactivos, y condiciones fisicoquímicas en que se estimula e induce la proliferación de la célula y se introduce el vector a la misma”*. Se informa que dicha reivindicación se modificó para recitar *“[u]n método para generar una célula CAR T que comprende transducir la célula efectora inmune con un vector lentiviral que codifica un CAR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9”*. En consecuencia, el Solicitante manifiesta que dicha reivindicación ahora es clara porque la persona experta entendería las medidas y límites del método reivindicado. La reconsideración y el retiro de esta objeción se solicita respetuosamente.

3.5 Su Despacho ha indicado que *“[l]as reivindicaciones 1 a 3 no son concisas porque reclaman la misma materia de invención que consiste en un receptor de antígeno quimérico con secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 9. Se sugiere restringir la solicitud a una reivindicación independiente que incluya todas las características técnicas esenciales, es decir la SEQ ID NO 9 del CAR”*. En respuesta a ello, el Solicitante respetuosamente manifiesta su completo desacuerdo y expresa que, las reivindicaciones 1 a 3 no repiten la misma materia porque los *“enlaces gramaticales”* que se recitan en las reivindicaciones son diferentes. La reivindicación 1 usa el enlace gramatical *“que comprende”*, la reivindicación 2 usa el enlace gramatical *“que consiste esencialmente en”*, y la reivindicación 3 usa el enlace gramatical *“que consiste en”*. El significado de dichos enlaces gramaticales se describe en la descripción tal como se presentó inicialmente:

“En toda la memoria descriptiva y salvo que el contexto requiera lo contrario, se debe entender que los términos «comprende», «comprende/n» y «que comprende» implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos indicados, pero no la exclusión de ninguna otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos. «Consiste en» significa que incluye, de modo taxativo, lo que siga en la frase «consiste en». Por lo tanto, la frase «consiste en» indica que los elementos mencionados son necesarios u obligatorios y que no pueden estar presentes otros elementos. «Consiste esencialmente en» significa que incluye cualquier elemento mencionado luego de la frase, con limitación a otros elementos que no interfieran con la actividad o acción especificada en la descripción para los elementos mencionados ni contribuyan con estas. Por lo tanto, la

frase «consiste esencialmente en» indica que los elementos mencionados son necesarios u obligatorios, pero no que no hay otros elementos presentes que afecten de forma material la actividad o acción de los elementos mencionados» (énfasis añadido) (Página 33, línea 8 a Página 34, línea 1).

De esta manera, es claro que las reivindicaciones 1 a 3 no reclaman la misma materia. Por lo tanto, respetuosamente se solicita la reconsideración y retiro de la objeción en cuestión.

- 3.6 El Examinador ha indicado que “[e]l solicitante no utiliza la estructura correcta en las reivindicaciones. Las reivindicaciones 4, 5, 7, 8, 10, 11 y 13 no son claras ya que no se encuentran adecuadamente definidas debido a que no tienen enlace gramatical “caracterizado por”, “que consiste”, “que comprende”, etc., los cuales son necesarios para poder establecer la parte caracterizante de las reivindicaciones. Se sugiere definir adecuadamente la invención indicando las partes caracterizantes de la invención”. Ante ello, el Solicitante nuevamente expresa su completo desacuerdo y expresa que, las reivindicaciones en cuestión utilizan el término “en donde” como enlace gramatical, el cual es ampliamente utilizado en el campo de las patentes para las reivindicaciones dependientes. De este modo, la materia reclamada es completamente clara y fácilmente entendida por una persona versada en la técnica. Por lo tanto, respetuosamente se solicita la reconsideración y retiro de la objeción en cuestión.

En consecuencia, nos permitimos indicar que el presente capítulo reivindicatorio, que incluye trece (13) reivindicaciones, se ajusta a las disposiciones del artículo 30 de la Decisión 486/00.

4. Descripción

Su Despacho ha indicado que “[l]a reivindicación 7 no es clara puesto que hace referencia a un vector episomal, sin embargo, en la descripción el solicitante hace referencia a un vector episomático y no un vector episomal. Se sugiere realizar la corrección pertinente”. En respuesta a ello, se informa que se presenta un nuevo capítulo descriptivo en el cual, el término “vector episomático” se reemplazó por el término correcto “vector episomal”. De esta manera, la objeción de claridad realizada a la antigua reivindicación 7 ha sido subsanada.

5. Novedad y Nivel Inventivo

De acuerdo con el oficio que se responde, una vez consultadas las fuentes de información accedidas por la Oficina de Patentes, no se encontraron documentos que

anticipen el objeto de la presente solicitud. De esta manera, la presente invención cumple las disposiciones de los artículos 16 y 18 de la Decisión 486/00.

Es así como a la luz de las modificaciones realizadas y de la evaluación positiva de la patentabilidad, se solicita respetuosamente se continúe el trámite de la presente solicitud y se emita la concesión de la misma.

Habiendo atendido cabalmente las objeciones presentadas por ese despacho, atentamente solicitamos se conceda el privilegio de patente de invención a la solicitud en estudio o si el señor Examinador considera que subsisten razones para objetar la presente invención, rogamos expedir otro examen de fondo con los debidos motivos y razones que sustenten su objeción con el fin de que nuestro mandante tenga la posibilidad de exponer sus argumentos con base en la interpretación de los artículos 45 de la Decisión 486 -el cual otorga la facultad al Examinador para emitir los exámenes de fondo- y 42 del Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo que señala que: “*habiéndose dado oportunidad a los interesados para expresar sus opiniones, y con base en las pruebas e informes disponibles, se tomará la decisión, que será motivada. La decisión resolverá todas las peticiones que hayan sido oportunamente planteadas dentro de la actuación por el peticionario y por los terceros reconocidos*”, (el subrayado es nuestro).

En consecuencia, solicitamos a ese Despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional.

Señor Director,


CAROLINA DAZA MONTALVO
C.C. 66.783.790 de Palmira Valle
TP-141563 CSJ
notificaciones@clarkemodet.com.co

ANEXOS

- Nuevo capítulo reivindicatorio conformado por trece (13) reivindicaciones.
- Nuevo capítulo descriptivo.
- Comprobante de pago de tasa correspondiente a nuevo examen de patentabilidad.

REIVINDICACIONES

1. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9.
2. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9.
3. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9.
4. Un polinucleótido que codifica un CAR, en donde la secuencia de polinucleótidos se expone en la SEQ ID NO: 10.
5. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 4, en donde el vector es un vector de expresión, un vector episomal, un vector viral, un vector retroviral, o un vector lentiviral.
6. El vector de la reivindicación 5, en donde el vector es un vector lentiviral seleccionado del grupo que consiste esencialmente en: virus de inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1), virus de inmunodeficiencia humana 2 (HIV-2), virus de visna-maedi (VMV), virus de artritis-encefalitis caprina (CAEV), virus de anemia infecciosa equina (EIAV), virus de inmunodeficiencia felina (FIV), virus de inmunodeficiencia bovina (BIV) y virus de inmunodeficiencia simia (SIV).
7. El vector de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende una LTR retroviral izquierda (5'), una señal de envoltura Psi (Ψ), una extensión central de polipurina/flap de ADN (cPPT/FLAP), un elemento de exportación retroviral, un promotor enlazado de forma operativa al polinucleótido de la reivindicación 4, y una LTR retroviral derecha (3').
8. El vector de la reivindicación 7, en donde el promotor de la 5' LTR se reemplaza con un promotor heterólogo, en donde el promotor heterólogo es un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor del virus de sarcoma de Rous (RSV) o un promotor del virus de simio 40 (SV40).

9. El vector de la reivindicación 7, en donde la 3' LTR comprende una LTR de autoinactivación (SIN).
10. Una célula efectora inmune que comprende el vector de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9.
11. La célula efectora inmune de la reivindicación 10, en donde la célula efectora inmune se selecciona del grupo que consiste en: un linfocito T y una célula citolítica natural (NK).
12. Una composición que comprende la célula efectora inmune de la reivindicación 10 o la reivindicación 11 y un excipiente fisiológicamente aceptable.
13. Un método para generar una célula CAR T que comprende transducir la célula efectora inmune con un vector lentiviral que codifica un CAR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9.

5

RECEPTORES DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS DE BCMA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio del título 35 del U.S.C. § 119 (e) de la solicitud provisional estadounidense n. ° 62/200,505, presentada el 3 de agosto de 2015 y la solicitud
10 provisional estadounidense n. ° 62/091,419, presentada el 12 de diciembre de 2014, cada una de las cuales se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

15 **DECLARACIÓN CON RESPECTO AL LISTADO DE SECUENCIAS**

El Listado de Secuencias asociado con esta solicitud se proporciona en formato de texto, en lugar de una copia en papel, y se incorpora a presente memoria descriptiva mediante esta referencia. El nombre del archivo de texto que contiene el
20 listado de secuencias es BLBD_043_02WO_ST25.txt. El archivo de texto tiene 27 KB y se creó el 4 de diciembre de 2015. Este se presenta por vía electrónica mediante EFS-Web, de manera simultánea con la presentación de la memoria descriptiva.

25 **ANTECEDENTES**

Campo técnico

La presente invención hace referencia a composiciones y métodos mejorados para tratar afecciones relacionadas con células B. De forma más particular, la invención hace referencia a receptores
5 de antígenos quiméricos (CAR, por su sigla en inglés) mejorados que comprenden anticuerpos anti-BCMA de murino o fragmentos de unión al antígeno de estos, células efectoras inmunes genéticamente modificadas para expresar estos CAR y uso de estas composiciones para tratar de forma eficaz afecciones
10 relacionados con células B.

Descripción de la técnica relacionada

Diversas enfermedades significativas involucran linfocitos B, es decir, células B. Una fisiología anómala de las células B
15 también puede llevar al desarrollo de enfermedades autoinmunes que incluyen, de modo no taxativo, lupus eritematoso sistémico (SLE, por su sigla en inglés). La transformación maligna de células B conduce a cánceres que incluyen, de modo no taxativo, linfomas, p. ej., mieloma múltiple y linfoma no Hodgkin.

20

La gran mayoría de los pacientes con neoplasias de células B, incluidos linfoma no Hodgkin (NHL, por su sigla en inglés) y mieloma múltiple (MM), constituyen una gran parte de la mortalidad por cáncer. La respuesta de neoplasias de células B

a diversas formas de tratamiento es mixta. Los métodos tradicionales para tratar las neoplasias de células B, incluidas la quimioterapia y la radioterapia, tienen una utilidad limitada debido a los efectos secundarios tóxicos. La inmunoterapia con anticuerpos terapéuticos anti-CD19, anti-CD20, anti-CD22, anti-CD23, anti-CD52, anti-CD80 y anti-HLA-DR ha brindado un éxito limitado, debido en parte a malos perfiles farmacocinéticos, rápida eliminación de los anticuerpos con proteasas séricas y filtración en el glomérulo, así como penetración limitada en el lugar del tumor y niveles de expresión del antígeno objetivo en las células cancerosas. Los intentos de utilizar células genéticamente modificadas con expresión de receptores de antígenos quiméricos (CAR) también han tenido un éxito limitado. Asimismo, la eficacia terapéutica de un dominio de unión al antígeno específico que se utilice en un CAR es impredecible: si el dominio de unión al antígeno se une con demasiada fuerza, las células T del CAR inducen una liberación masiva de citocinas que produce una reacción inmunológica posiblemente fatal que se considera una «tormenta de citocinas» y, si el dominio de unión al antígeno se une con demasiada debilidad, las células T del CAR no presentan suficiente eficacia terapéutica en la eliminación de las células cancerosas.

BREVE COMPENDIO

La invención brinda, en términos generales, vectores mejorados para generar terapias de células T y métodos para utilizarlas.

5

En diversas modalidades, se brinda un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende: un dominio extracelular que comprende un antígeno anti-BCMA (antígeno de maduración de células B, por su sigla en inglés) de murino o fragmento de
10 unión al antígeno de este que se une a uno o más epítomos de un polipéptido de BCMA humano, un dominio transmembrana, uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelular y un dominio de señalización primaria.

15 En modalidades particulares, el anticuerpo anti-BCMA de murino o fragmento de unión al antígeno que se une al polipéptido de BCMA humano se selecciona del grupo que consiste en: una IG de camello, NAR de Ig, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab)'2, fragmentos F(ab)'3, Fv,
20 anticuerpo Fv de cadena simple («scFv»), bis-scFv, (scFv)2, minicuerpo, diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, proteína Fv estabilizada con disulfuro («dsFv») y anticuerpo de dominio simple (sdAb, nanocuerpo).

En modalidades adicionales, el anticuerpo anti-BCMA de murino o fragmento de unión al antígeno que se une al polipéptido de BCMA humano es un scFv.

- 5 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-BCMA de murino o fragmento de unión al antígeno de este comprende una o más CDR, como se indica en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-3.

En modalidades particulares, el anticuerpo anti-BCMA de murino o fragmento de unión al antígeno de este comprende una o más CDR, como se indica en cualquiera de las SEQ ID NO: 4-6.

En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-BCMA de murino o fragmento de unión al antígeno de este comprende una secuencia de cadena ligera variable como se indica en la SEQ ID NO: 7.

En modalidades particulares, la cadena ligera variable comprende las secuencias de CDR indicadas en las SEQ ID NO: 1-3.

En otras modalidades, el anticuerpo anti-BCMA de murino o fragmento de unión al antígeno de este comprende una

secuencia de cadena pesada variable como se indica en la SEQ
ID NO: 8.

En modalidades adicionales, la cadena pesada variable
5 comprende las secuencias de CDR indicadas en las SEQ ID NO:
4-6.

En otras modalidades, el dominio transmembrana proviene de un
polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: cadena
10 alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD4,
CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45,
CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154 y PD1.

En algunas modalidades, el dominio transmembrana proviene de
15 un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: CD8 α ;
CD4, CD45, PD1 y CD154.

En determinadas modalidades, el dominio transmembrana
proviene de CD8 α .
20

En modalidades particulares, el o los dominios de
señalización coestimuladora provienen de una molécula
coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en:
CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83,

CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4),
 CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1),
 CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM y ZAP70.

5 En modalidades particulares, el o los dominios de
 señalización coestimuladora provienen de una molécula
 coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CD28,
 CD134 y CD137.

10 En modalidades adicionales, el o los dominios de señalización
 coestimuladora provienen de una molécula coestimuladora
 seleccionada del grupo que consiste en: CD28, CD134 y CD137.

En modalidades adicionales, el o los dominios de señalización
 15 coestimuladora provienen de CD28.

En modalidades particulares, el o los dominios de
 señalización coestimuladora provienen de CD134.

20 En otras modalidades, el o los dominios de señalización
 coestimuladora provienen de CD137.

En determinadas modalidades, un CAR comprende un polipéptido
 de región bisagra.

En otras modalidades, el polipéptido de región bisagra comprende una región bisagra de CD8 α .

- 5 En algunas modalidades, un CAR comprende una región separadora.

En modalidades adicionales, el polipéptido de región separadora comprende regiones CH2 y CH3 de IgG1 o IgG4.

10

En modalidades particulares, un CAR comprende un péptido señal.

- En otras modalidades, el péptido señal comprende un polipéptido señal de cadena pesada de IgG1, péptido señal del receptor del factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos 2 (GM-CSFR2) o un polipéptido señal de CD8 α .
- 15

- 20 En una modalidad, un CAR comprende una secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 9.

En diversas modalidades, se brinda un polinucleótido que codifica un CAR contemplado en la presente.

En diversas modalidades particulares, se brinda un polinucleótido que codifica un CAR, en el que la secuencia de polinucleótidos se indica en la SEQ ID NO: 10.

5

En diversas modalidades determinadas, se brinda un vector que comprende un polinucleótido que codifica un CAR contemplado en la presente o como se indica en la SEQ ID NO: 10.

10 En determinadas modalidades, el vector es un vector de expresión.

En modalidades adicionales, el vector es un vector episomal.

15 En modalidades particulares, el vector es un vector viral.

En otras modalidades, el vector es un vector retroviral.

En otras modalidades, el vector es un vector lentiviral.

20

En una modalidad, un vector que codifica un CAR de BCMA comprende la secuencia de polinucleótidos que se indica en la SEQ ID NO: 36.

En modalidades adicionales, el vector lentiviral se selecciona del grupo que consiste esencialmente en: virus de inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1), virus de inmunodeficiencia humana 2 (HIV-2), virus de visna-maedi
5 (VMV), virus de artritis-encefalitis caprina (CAEV), virus de anemia infecciosa equina (EIAV), virus de inmunodeficiencia felina (FIV), virus de inmunodeficiencia bovina (BIV) y virus de inmunodeficiencia simia (SIV).

10 En modalidades particulares, un vector comprende una LTR retroviral izquierda (5'), una señal de envoltura Psi (Ψ), una extensión central de polipurina/flap de ADN (cPPT/FLAP, por su sigla en inglés), un elemento de exportación retroviral, un promotor enlazado de forma operativa al
15 polinucleótido que codifica un CAR contemplado en la presente y una LTR retroviral derecha (3').

En otras modalidades, un CAR comprende una secuencia de poliadenilación heteróloga.

20

En algunas modalidades, un CAR comprende un elemento regulador postranscripción del virus de hepatitis B (HPRE, por su sigla en inglés) o elemento regulador postranscripción de la marmota (WPRE, por su sigla en inglés).

En determinadas modalidades, el promotor de la LTR 5' se reemplaza con un promotor heterólogo.

5 En otras modalidades, el promotor heterólogo es un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor del virus de sarcoma de Rous (RSV, por su sigla en inglés) o un promotor del virus de simio 40 (SV40, por su sigla en inglés).

10 En modalidades particulares, la LTR 5' o LTR 3' es una LTR de lentivirus.

En modalidades particulares, la LTR 3' comprende una o más modificaciones.

15

En algunas modalidades, la LTR 3' comprende una o más eliminaciones.

En determinadas modalidades, la LTR 3' es una LTR de
20 autoinactivación (SIN, por su sigla en inglés).

En algunas modalidades, la secuencia de poliadenilación es una secuencia de señal de poliadenilación de β -globina de conejo o de poliadenilación de la hormona de crecimiento

bovina.

En modalidades adicionales, un polinucleótido que codifica un CAR contemplado en la presente comprende una secuencia de Kozak optimizada.

En otras modalidades, el promotor enlazado de forma operativa al polinucleótido que codifica un CAR contemplado en la presente se selecciona del grupo que consiste en: un promotor temprano del gen intermedio de citomegalovirus (CMV), un promotor alfa del factor de elongación 1 (EF1- α), un promotor de fosfoglicerato cinasa 1 (PGK), un promotor de ubiquitina C (UBQ-C), un potenciador de citomegalovirus/promotor de beta actina de pollo (CAG), potenciador de poliovirus/promotor de timidina cinasa de herpes simple (MC1), un promotor de beta actina (β -ACT), un promotor del virus de simio 40 (SV40) y un potenciador del virus de sarcoma mieloproliferativo, promotor con lugar de unión al cebador dl587rev sustituido y región de control negativo eliminada (MND).

20

En diversas modalidades, se brinda una célula efectora inmune que comprende un vector contemplado en la presente. En diversas modalidades, la célula efectora inmune se transduce con un vector contemplado en la presente.

En modalidades adicionales, la célula efectora inmune se selecciona del grupo que consiste en: un linfocito T y una célula citolítica natural (NK).

5

En algunas modalidades, la célula efectora inmune se transduce con el vector de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 46 y se activa y estimula en presencia de un inhibidor de la vía de PI3K, con lo cual mantiene la proliferación de las células efectoras inmunes transducidas en comparación con la proliferación de células efectoras inmunes transducidas activadas y estimuladas sin el inhibidor de la vía de PI3K.

En modalidades particulares, la célula efectora inmune activada y estimulada en presencia del inhibidor de la vía de PI3K tiene mayor expresión de i) uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en: CD62L, CD127, CD197 y CD38 o ii) todos los marcadores CD62L, CD127, CD197 y CD38, en comparación con una célula efectora inmune activada y estimulada sin el inhibidor de la vía de PI3K.

En una modalidad, el inhibidor de PI3K es ZSTK474.

En diversas modalidades, se brinda una composición que

comprende una célula efectora inmune contemplada en la presente y un excipiente fisiológicamente aceptable.

En diversas modalidades, se brinda un método para generar una
5 célula efectora inmune que comprende un CAR contemplado en la presente, que comprende introducir en una célula efectora inmune un vector que comprenda un polinucleótido que codifique el CAR.

10 En modalidades adicionales, el método comprende además estimular la célula efectora inmune e inducir la proliferación celular mediante contacto de la célula con anticuerpos que se unan a CD3 y anticuerpos que se unan a CD28, con lo cual se genera una población de células
15 efectoras inmunes.

En modalidades particulares, la célula efectora inmune se estimula y se induce su proliferación antes de introducir el vector.

20

En determinadas modalidades, las células efectoras inmunes comprenden linfocitos T.

En modalidades particulares, las células efectoras inmunes

comprenden células NK.

En modalidades particulares, las células se activan y estimulan en presencia de un inhibidor de la vía de PI3K, con lo cual mantiene la proliferación de las células efectoras inmunes transducidas en comparación con la proliferación de células efectoras inmunes activadas y estimuladas sin el inhibidor de la vía de PI3K.

En algunas modalidades, las células efectoras inmunes activadas y estimuladas en presencia del inhibidor de la vía de PI3K tienen mayor expresión de i) uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en: CD62L, CD127, CD197 y CD38 o ii) todos los marcadores CD62L, CD127, CD197 y CD38, en comparación con células efectoras inmunes activadas y estimuladas sin el inhibidor de la vía de PI3K.

En una modalidad, el inhibidor de PI3K es ZSTK474.

En diversas modalidades, se brinda un método para tratar una afección relacionada con células B en un sujeto que lo necesite, que comprende administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprenda células T de CAR de BCMA contempladas en la presente y,

opcionalmente, un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otras modalidades, la afección relacionada con células B es mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, proliferaciones de
5 células B de potencial neoplásico incierto, granulomatosis linfomatoide, trastorno linfoproliferativo postrasplante, un trastorno inmunorregulador, artritis reumatoide, miastenia gravis, trombocitopenia púrpura idiopática, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Chagas, enfermedad de Grave,
10 granulomatosis de Wegener, poliarteritis nodosa, síndrome de Sjogren, pénfigo vulgar, escleroderma, esclerosis múltiple, síndrome antifosfolípido, vasculitis asociada con ANCA, enfermedad de Goodpasture, enfermedad de Kawasaki, anemia hemolítica autoinmune y glomerulonefritis de avance rápido,
15 enfermedad de cadena pesada, amiloidosis asociada con inmunocitos o primaria o gammapatía monoclonal de significancia indeterminada.

En otras modalidades, la afección relacionada con células B
20 es una neoplasia de células B.

En determinadas modalidades, la neoplasia de células B es mieloma múltiple (MM) o linfoma no Hodgkin (NHL).

En determinadas modalidades, el MM se selecciona del grupo que consiste en: mieloma múltiple manifiesto, mieloma múltiple quiescente, leucemia de células plasmáticas, mieloma no secretor, mieloma de IgD, mieloma osteoesclerótico, 5 plamacitoma solitario de los huesos y plasmacitoma extramedular.

En algunas modalidades, el NHL se selecciona del grupo que consiste en: linfoma de Burkitt, leucemia linfocítica 10 crónica/linfoma linfocítico pequeño (CLL/SLL), linfoma de células B grandes difusas, linfoma folicular, linfoma de células grandes inmunoblásticas, linfoma linfoblástico B precursor y linfoma de células del manto.

15 En modalidades particulares, la afección relacionada con células B es una neoplasia de células plasmáticas.

En otras modalidades, la afección relacionada con células B es una enfermedad autoinmune.

20

En modalidades adicionales, la enfermedad autoinmune es lupus eritematoso sistémico.

En determinadas modalidades, la afección relacionada con

células B es artritis reumatoide.

En modalidades particulares, la afección relacionada con
células B es púrpura trombocitopénica idiopática o miastenia
5 grave o anemia hemolítica autoinmune.

BREVE DESCRIPCIÓN DE DIVERSAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

La **figura 1** muestra un esquema de construcciones CAR del
antígeno de maduración de células B de murino (muBCMA, por su
10 sigla en inglés).

La **figura 2a** muestra la cantidad de IFNg que se libera de
células T de CAR anti-BCMA02, células T de CAR anti-BCMA10 y
células T de CAR19Δ luego de haber cultivado conjuntamente las
15 células durante 24 horas con células K562 con expresión de
BCMA.

La **figura 2b** muestra la cantidad de IFNg que se libera de
células T de CAR anti-BCMA02, células T de CAR anti-BCMA10 y
20 células T CAR19Δ luego de haber cultivado conjuntamente las
células durante 24 horas con células K562 sin expresión de BCMA
en comparación con células K562 con expresión de BCMA.

La **figura 3** muestra la cantidad de citocinas inflamatorias en

medio de crecimiento de células T de control sin transducción, células T de CAR anti-BCMA02, células T de CAR anti-BCMA10 y células T CAR19 Δ , estimuladas 10 días antes del ensayo.

5 La **figura 4** muestra la cantidad de citocinas inflamatorias producida mediante células T de CAR anti-BCMA02, células T de CAR anti-BCMA10 y células T de CAR19 Δ sin estimulación de antígeno.

10 La **figura 5** muestra la expresión de marcadores fenotípicos de activación al final de la elaboración de células T de CAR anti-BCMA. Se midió la expresión de HLA-DR y CD25 en células T de CAR anti-BCMA02, células T de CAR anti-BCMA10 y células T de CAR19 Δ .

15

La **figura 6** muestra los niveles de caspasa 3 activada, una etapa necesaria en la apoptosis e importante para AICD en células T de CAR anti-BCMA10 y células T de CAR anti-BCMA02 sin estimulación de antígeno.

20

La **figura 7** muestra la cantidad de liberación de citocina inflamatoria en células T de CAR anti-BCMA02 y anti-BCMA10 en medios con suero bovino fetal (FBS, por su sigla en inglés), suero AB humano (HABS, por su sigla en inglés) o 100 ng/ml de

BCMA soluble.

La **figura 8A** muestra el volumen tumoral en ratones NOD scid gamma (NSG) con tumores de mieloma múltiple humano subcutáneo experimental (RPMI-8226) de ~100 mm³. Los ratones se trataron con vehículo, 10⁷ células T de CAR anti-BCMA02, 10⁷ células T de CAR anti-BCMA10 o Bortezomib (velcade).

La **figura 8B** muestra el volumen tumoral en ratones NOD scid gamma (NSG) con tumores de mieloma múltiple humano subcutáneo experimental (RPMI-8226) de ~100 mm³. Los ratones se trataron con vehículo, 10⁷ células T de CAR anti-BCMA02, 10⁷ células T de CAR anti-BCMA10 o Bortezomib (velcade).

La **figura 9** muestra el nivel de expresión de BCMA en líneas celulares de linfoma y leucemia (círculos) y la actividad de las células T de CAR anti-BCMA con respecto a cada línea celular (liberación de IFN γ , recuadros). Las líneas celulares tumorales negativas para BCMA (BCMA-): leucemia mielógena (K562), leucemia linfoblástica aguda (NALM-6 y NALM-16), linfoma de células del manto (REC-1) o linfoma de Hodgkin (HDLM-2) mostraron escasa o nula liberación de IFN γ . Las líneas celulares tumorales positivas para BCMA (BCMA+): leucemia linfoblástica crónica de células B (MEC-1), linfoma

de células del manto (JeKo-1), linfoma de Hodgkin (RPMI-6666), linfoma de Burkitt (células de Daudi y células de Ramos) y mieloma múltiple (RPMI-8226) mostraron una liberación sustancial de IFN γ .

5

La **figura 10A** muestra la actividad *in vivo* del vehículo, las células T de CAR antiCD19 Δ , las células T de CAR anti-CD19 y las células T de CAR anti-BCMA con respecto a células de linfoma de Burkitt con expresión de BCMA (células de Daudi) en un modelo de ratón NSG, cuando las células T de CAR se administran a los ratones a los 8 días desde la inducción tumoral.

La **figura 10B** muestra la actividad *in vivo* del vehículo, las células T de CAR antiCD19 Δ , las células T de CAR anti-CD19 y las células T de CAR anti-BCMA con respecto a células de linfoma de Burkitt con expresión de BCMA (células de Daudi) en un modelo de ratón NSG, cuando las células T de CAR se administran a los ratones a los 18 días desde la inducción tumoral.

20

La **figura 11** muestra actividad potente *in vitro* de células T de CAR anti-BCMA lograda con una reducción del 50 por ciento en la expresión de CAR anti-BCMA. (a) Las poblaciones de

células T se transdujeron con entre 4×10^8 y 5×10^7 unidades de transducción de un lentivirus con codificación de una molécula de CAR anti-BCMA (MOI de 5 a 40). Las poblaciones de células T resultantes se normalizaron para incluir 26 ± 4 %
5 de células T positivas para CAR anti-BCMA. (B) La MFI de las células T de CAR anti-BCMA normalizadas osciló entre 885 y 1875, según el análisis de citometría de flujo. (C) Las células BCMA K562 y K-562 se cultivaron en conjunto con células T de CAR anti-BCMA normalizadas a una relación de
10 20:1 o 10:1 de efector (E, célula T) a objetivo (T, mezcla 1:1 de célula BCMA K562 y K562) mostraron actividad citolítica comparable.

La **figura 12** muestra la confiabilidad del proceso de
15 fabricación de células T de CAR anti-BCMA. (A) los productos de células T de CAR anti-BCMA fabricados a partir de PBMC de 11 donantes individuales mostró niveles comparables de expansión en comparación con un cultivo en correspondencia de células T de donantes sin transducción. (B) los productos de
20 células T de CAR anti-BCMA fabricados a partir de 11 donantes mostraron eficacia de transducción lentiviral comparable (VCN). (C) La frecuencia de las células T positivas para CAR anti-BCMA se midió con citometría de flujo y se descubrió que la expresión de BCMA era comparable en todos los donantes.

(D) Los productos de células T de CAR anti-BCMA elaborados a partir de 11 donantes mostraron niveles terapéuticamente relevantes de liberación de IFN γ al exponerse a células K562 con expresión de BCMA.

5

La **figura 13** muestra diagramas de Venn para expresión conjunta de CD127, CD197 y CD38 en células T anti-BCMA02 positivas para CD62L cultivadas en presencia de IL-2 o IL-2 y ZSTK474 durante diez días. Las células T de CAR anti-BCMA02
10 tratadas con ZSTK474 mostraron un aumento en el porcentaje de células con expresión conjunta de CD127, CD197 y CD38 en comparación con células T de CAR anti-BCMA cultivadas solo con IL-2.

15 La **figura 14** muestra un mayor porcentaje de CD8 con expresión de células T de CAR anti-BCMA02 en cultivos tratados con IL-2 y ZSTK474 (n=7), en comparación con cultivos tratados solo con IL-2. La expresión de CD8 se determinó utilizando un anticuerpo anti-CD8 etiquetado de forma fluorescente y
20 citometría de flujo.

La **figura 15** muestra la cantidad de IFN- γ liberado de células T de CAR anti-BCMA02 de 14 donantes luego del cultivo solo con IL-2 o con IL-2 y ZSTK474. Al final del período de

cultivo, se volvió a cultivar una cantidad equivalente de células T de CAR anti-BCMA02 durante 24 horas solamente en medio. La cantidad de IFN- γ liberado en 24 horas se cuantificó mediante ELISA. El cultivo en ZSTK474 no aumentó
5 de forma considerable la liberación tónica de citocinas de células T de CAR anti-BCMA02 en comparación con las células T de CAR anti-BCMA02 cultivadas solo con IL-2.

La **figura 16** muestra actividad antitumoral de células T de
10 CAR anti-BCMA02 tratadas con IL-2 o IL-2 y ZSTK474 o una célula T de CAR anti-BCMA02 de señalización deficiente trunca (tBCMA02) tratada con IL-2 y ZSTK474 en un modelo tumoral de Daudi agresivo. Se observó regresión completa del tumor en el 50 % de los ratones que recibieron las células T de CAR anti-
15 BCMA02 tratadas con IL-2 y ZSTK474.

La **figura 17** muestra la actividad antitumoral de células T de CAR anti-BCMA02 tratadas con IL-2 o IL-2 y ZSTK474 en un modelo tumoral de mieloma múltiple (RPMI-8226). Los animales
20 tratados con células T de CAR anti-BCMA02 cultivadas con IL-2 o IL-2 y ZSTK474 evitaron por completo el sobrecrecimiento tumoral.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS IDENTIFICADORES DE SECUENCIA

Las **SEQ ID NO: 1-3** indican las secuencias de aminoácidos de ejemplos de secuencias de CDR de cadena ligera para los CAR BCMA contemplados en la presente.

- 5 Las **SEQ ID NO: 4-6** indican las secuencias de aminoácidos de ejemplos de secuencias de CDR de cadena pesada para los CAR BCMA contemplados en la presente.

La **SEQ ID NO: 7** indica la secuencia de aminoácidos de un
10 ejemplo de secuencias de cadena ligera para los CAR BCMA contemplados en la presente.

La **SEQ ID NO: 8** indica la secuencia de aminoácidos de un
ejemplo de secuencias de cadena pesada para los CAR BCMA
15 contemplados en la presente.

La **SEQ ID NO: 9** indica la secuencia de aminoácidos de un ejemplo de CAR BCMA contemplado en la presente.

20 La **SEQ ID NO: 10** indica una secuencia de polinucleótidos que codifica un ejemplo de CAR BCMA contemplado en la presente.

La **SEQ ID NO: 11** indica la secuencia de aminoácidos del BCMA humano.

La **SEQ ID NO: 12-22** indican la secuencia de aminoácidos de diversos enlazadores.

- 5 **Las SEQ ID NO: 23-35** indican la secuencia de aminoácidos de lugares de escisión de proteasa y lugares de escisión de polipéptidos de autoescisión.

La **SEQ ID NO: 36** indica la secuencia de polinucleótidos de un
10 vector que codifica un CAR BCMA.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A. INFORMACIÓN GENERAL

- 15 La invención hace referencia, en términos generales, a composiciones y métodos mejorados para tratar afecciones relacionadas con células B. Tal como se utiliza en la presente, el término «afecciones relacionadas con células B» hace referencia a afecciones que implican actividad inadecuada de
20 células B y neoplasias de células B.

En modalidades particulares, la invención hace referencia a una terapia mejorada de células adoptivas de afecciones relacionadas con células B que utiliza células efectoras
25 inmunes genéticamente modificadas. Los enfoques genéticos

ofrecen un posible medio para potenciar el reconocimiento inmune y la eliminación de células cancerosas. Una estrategia prometedora es modificar genéticamente células efectoras inmunes para expresar receptores de antígeno quimérico (CAR) que redirijan la citotoxicidad hacia las células cancerosas. No obstante, las inmunoterapias de células adoptivas existentes para tratar trastornos de células B presentan un riesgo grave de comprometer la inmunidad humoral, debido a que las células se dirigen a antígenos expresados en la totalidad o la mayoría de las células B. Por consiguiente, estas terapias no resultan clínicamente deseables y, por ello, sigue existiendo una necesidad en la técnica de contar con terapias más eficaces para afecciones relacionadas con células B que no afecten la inmunidad humoral.

15

Las composiciones y los métodos mejorados de terapia con células adoptivas que se describen en la presente brindan células efectoras inmunes genéticamente modificadas que se pueden expandir con facilidad, presentan persistencia a largo plazo *in vivo* y reducen la alteración de la inmunidad humoral dirigiéndose al antígeno de maduración de células B con expresión de células B (BCMA, también conocido como CD269 o miembro 17 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, TNFRSF17, por su sigla en inglés).

20

El BCMA es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (remitirse, p. ej., a Thompson *et ál.*, *J. Exp. Medicine*, 192(1): 129-135, 2000, y Mackay *et ál.*, *Annu. Rev. Immunol*, 21: 231-264, 2003. El BCMA se une al factor de activación de células B (BAFF, por su sigla en inglés) y un ligando de inducción de la proliferación (APRIL, por su sigla en inglés) (remitirse, p. ej., a Mackay *et ál.*, 2003 y Kalled *et ál.*, *Immunological Reviews*, 204: 43-54, 2005). Entre las células no malignas, se ha indicado que el BCMA se expresa principalmente en las células plasmáticas y subconjuntos de células B maduras (remitirse, p. ej., a Laabi *et ál.*, *EMBO J.*, 77(1): 3897-3904, 1992; Laabi *et ál.*, *Nucleic Acids Res.*, 22(7): 1147-1154, 1994; Kalled *et ál.*, 2005; O'Connor *et ál.*, *J. Exp. Medicine*, 199(1): 91-97, 2004 y Ng *et ál.*, *J. Immunol.*, 73(2): 807-817, 2004. Los ratones deficientes en BCMA son saludables y tienen cantidades normales de células B, pero la supervivencia de células plasmáticas de larga supervivencia se ve afectada (remitirse, p. ej., a O'Connor *et ál.*, 2004; Xu *et ál.*, *Mol. Cell. Biol*, 21(12): 4067-4074, 2001 y Schiemann *et ál.*, *Science*, 293(5537): 2 111-21 14, 2001). El ARN de BCMA se ha detectado a nivel universal en células de mieloma múltiple y en otros linfomas y diversos investigadores han detectado la proteína de BCMA en la superficie de células plasmáticas de

pacientes con mieloma múltiple (remitirse, p. ej., a Novak et ál., *Blood*, 103(2): 689-694, 2004; Neri et ál., *Clinical Cancer Research*, 73(19): 5903-5909, 2007; Bellucci et ál., *Blood*, 105(10): 3945-3950, 2005 y Moreaux et ál., *Blood*, 703(8): 3148-
5 3157, 2004.

En diversas modalidades, los CAR con secuencias de anticuerpo anti-BCMA de murino son altamente eficaces en comparación con los CAR de BCMA que comprenden secuencias particulares de
10 anticuerpos humanos, experimentan una fuerte expansión *in vivo* y reconocen células B humanas con expresión de BCMA, muestran actividad citotóxica contra los BCMA con expresión de células B y no muestran signos de inducción de tormenta de citocinas, una afección posiblemente fatal en la que las citocinas liberadas
15 por las células T activadas crean una respuesta inflamatoria repentina en el sistema que desata una fiebre no infecciosa.

En una modalidad, se brinda un CAR que comprende un anticuerpo anti-BCMA de murino o fragmento de unión al antígeno, un
20 dominio transmembrana y uno o más dominios de señalización intracelular.

En una modalidad, se presenta una célula efectora inmune genéticamente modificada para expresar un CAR contemplado en la

presente. Las células T con expresión de un CAR se indican en la presente como células T de CAR o células T de CAR modificadas.

5 En diversas modalidades, las células efectoras inmunes modificadas genéticamente contempladas en la presente se administran a un paciente con una afección relacionada con células B, p. ej., una enfermedad autoinmune asociada con células B o una neoplasia de células B.

10

La práctica de la invención utilizará, salvo que se especifique lo contrario, métodos convencionales de la química, bioquímica, química orgánica, biología molecular, microbiología, técnicas de ADN recombinante, genética, inmunología y biología celular
 15 que se encuentran dentro de la pericia en la técnica, muchos de los cuales se describen a continuación con fines ilustrativos. Estas técnicas se explican por completo en la bibliografía. Remitirse, p. ej., a Sambrook, et ál., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª edición, 2001), Sambrook, et ál.,
 20 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, 1989); Maniatis et ál., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); Ausubel et ál., *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley e hijos, actualizado en julio de 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current*

Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates y Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, tomos I y II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, Nueva York, 1992); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); Harlow y Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) *Current Protocols in Immunology* Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach y W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology*, así como monografías en jornales como *Advances in Immunology*.

B. DEFINICIONES

Salvo que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado comúnmente entendido por los expertos en la técnica a la que pertenece la invención. Si bien en la práctica o en el análisis de la presente invención se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente, en la presente se describen modalidades de composiciones, métodos y materiales preferidos. A efectos de la presente invención, a continuación se definen los siguientes términos.

Los artículos «un», «una», «el» y «la» se usan en la presente para hacer referencia a uno o a más de uno (es decir, al menos a uno o a uno o más) de los objetos gramaticales del artículo.

5 A modo de ejemplo, «un elemento» significa un elemento o uno o más elementos.

Debe entenderse que el uso de la forma alternativa (p. ej., «o») significa una, ambas o cualquier combinación de estas
10 alternativas.

El término «y/o» debe comprenderse como una indicación de una o ambas de las alternativas.

15 Tal como se utiliza en la presente, el término «alrededor de» o «aproximadamente» hace referencia a una cantidad, un nivel, un valor, un número, una frecuencia, un porcentaje, una dimensión, un tamaño, un monto, un peso o una longitud que varía en tanto como 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 %
20 con respecto a una cantidad, un nivel, un valor, un número, una frecuencia, un porcentaje, una dimensión, un tamaño, un monto, un peso o una longitud de referencia. En una modalidad, el término «alrededor de» o «aproximadamente» hace referencia a un intervalo de cantidad, nivel, valor, número, frecuencia,

porcentaje, dimensión, tamaño, monto, peso o longitud $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 9\%$, $\pm 8\%$, $\pm 7\%$, $\pm 6\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$ $\pm 1\%$ con respecto a una cantidad, un nivel, un valor, un número, una frecuencia, un porcentaje, una dimensión, un tamaño, un monto, un peso o una longitud de referencia.

En toda la memoria descriptiva y salvo que el contexto requiera lo contrario, se debe entender que los términos «comprende», «comprende/n» y «que comprende» implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos indicados, pero no la exclusión de ninguna otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos. «Consiste en» significa que incluye, de modo taxativo, lo que siga en la frase «consiste en». Por lo tanto, la frase «consiste en» indica que los elementos mencionados son necesarios u obligatorios y que no pueden estar presentes otros elementos. «Consiste esencialmente en» significa que incluye cualquier elemento mencionado luego de la frase, con limitación a otros elementos que no interfieran con la actividad o acción especificada en la descripción para los elementos mencionados ni contribuyan con estas. Por lo tanto, la frase «consiste esencialmente en» indica que los elementos mencionados son necesarios u obligatorios, pero no que no hay otros elementos presentes que afecten de forma material la actividad o acción de los elementos mencionados.

La referencia en toda la presente memoria descriptiva a «una modalidad», «una modalidad particular», «una modalidad relacionada», «una determinada modalidad», «una modalidad adicional» u «otra modalidad» o combinaciones de estos significa que un elemento, una estructura o una característica particular descrita en conexión con la modalidad se incluye en al menos una modalidad de la presente invención. Por lo tanto, la aparición de las frases precedentes en diversos puntos en toda la presente memoria descriptiva no necesariamente hace referencia a la misma modalidad. Además, los elementos, las estructuras o las características particulares se pueden combinar de cualquier forma adecuada en una o más modalidades. También se comprende que la mención positiva de un elemento en una modalidad sirve como base para la exclusión del elemento en una modalidad particular.

C. RECEPTORES DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS

En diversas modalidades, se brindan receptores genéticamente modificados que redirigen la citotoxicidad de las células efectoras inmunes hacia las células B. Estos receptores genéticamente modificados se indican en la presente como receptores de antígenos quiméricos (CAR). Los CAR son moléculas que combinan la especificidad basada en anticuerpo con respecto

a un antígeno deseado (p. ej., BCMA) con un dominio intracelular de activación del receptor de células T para generar una proteína quimérica que presente una actividad inmunológica celular anti-BCMA específica. Tal como se utiliza
5 en la presente, el término «quimérico/a» describe el hecho de estar compuesto/a por partes de diferentes proteínas o ADN de diferentes orígenes.

Los CAR contemplados en la presente comprenden un dominio
10 extracelular (también indicado como un dominio de unión o dominio de unión específico del antígeno) que se une a BCMA, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. El contacto del dominio de unión al antígeno anti-BCMA del CAR con el BCMA en la superficie de una célula
15 objetivo produce un agrupamiento del CAR y suministra un estímulo de activación a la célula con CAR. La principal característica de los CAR es su capacidad para redirigir la especificidad de la célula efectora inmune, con lo cual se desencadena la proliferación, la producción de citocinas, la
20 fagocitosis o la producción de moléculas que pueden mediar la muerte celular de la célula con expresión del antígeno objetivo de forma independiente de la histocompatibilidad principal (MHC, por su sigla en inglés), y así se explotan las capacidades de direccionamiento específico de la célula de

anticuerpos monoclonales, ligandos solubles o receptores conjuntos específicos de la célula.

En diversas modalidades, un CAR comprende un dominio de unión
5 extracelular que comprende un dominio de unión específico anti-BCMA de murino, un dominio transmembrana, uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelular y un dominio de señalización primaria.

10 En modalidades particulares, un CAR comprende un dominio de unión extracelular que comprende un anticuerpo anti-BCMA de murino o fragmento de unión al antígeno de este, uno o más dominios de bisagra o dominios separadores, un dominio transmembrana que incluye uno o más dominios de señalización
15 coestimuladora intracelulares y un dominio de señalización primaria.

1. DOMINIO DE UNIÓN

En modalidades particulares, los CAR contemplados en la
20 presente comprenden un dominio de unión extracelular que comprende un anticuerpo anti-BCMA de murino o fragmento de unión al antígeno de este que se une de forma específica a un polipéptido de BCMA humano expresado en una célula B. Tal como se utilizan en la presente, los términos «dominio de unión»,

«dominio extracelular», «dominio de unión extracelular»,
«dominio de unión específico del antígeno» y «dominio de unión
específico del antígeno extracelular» se utilizan de forma
intercambiable y brindan un CAR con la capacidad de unirse de
5 forma específica al antígeno objetivo de interés, p. ej., BCMA.
El dominio de unión puede derivarse de una fuente natural,
sintética, semisintética o recombinante.

Los términos «afinidad de unión específica» o «se une de forma
10 específica» o «unido/a de forma específica» o «que se une de
forma específica» o «se dirige de forma específica», tal como
se utilizan en la presente, describen la unión de un anticuerpo
anti-BCMA o fragmento de unión al antígeno de este (o un CAR
que los comprende) al BCMA con una afinidad de unión mayor al
15 dominio de referencia. Un dominio de unión (o un CAR que
comprende un dominio de unión o una proteína de fusión con un
dominio de unión) «se une de forma específica» a un BCMA si se
une o asocia con el BCMA con una afinidad o K_a (es decir, una
constante de asociación en equilibrio de una interacción de
20 unión particular con unidades de $1/M$), por ejemplo, mayor o
igual a alrededor de $10^5 M^{-1}$. En determinadas modalidades, un
dominio de unión (o una proteína de fusión de este) se une a un
objetivo con una K_a mayor o igual a alrededor de $10^6 M^{-1}$, $10^7 M^{-1}$,
 $10^8 M^{-1}$, $10^9 M^{-1}$, $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$, $10^{12} M^{-1}$ o $10^{13} M^{-1}$. Dominios

de unión de «gran afinidad» (o proteínas de fusión de cadena simple de estos) hace referencia a los dominios de unión con una K_a de al menos 10^7 M^{-1} , al menos 10^8 M^{-1} , al menos 10^9 M^{-1} , al menos 10^{10} M^{-1} , al menos 10^{11} M^{-1} , al menos 10^{12} M^{-1} , al menos 10^{13} M^{-1} o mayor.

De forma alternativa, la afinidad se puede definir como una constante de disociación en equilibrio (K_d) de una interacción de unión particular con unidades de M (p. ej., 10^{-5} M a 10^{-13} M o menos). Las afinidades de proteína CAR y polipéptidos de dominio de unión de acuerdo con la presente descripción se pueden determinar fácilmente utilizando técnicas convencionales, p. ej., mediante ELISA (ensayo de inmunoabsorción enlazado por enzima) de competencia o mediante asociación de unión o ensayos de desplazamiento con ligandos etiquetados o utilizando un dispositivo de resonancia de plasmones superficiales como el Biacore T100, que se puede obtener de Biacore, Inc., Piscataway, NJ, o tecnología de biosensor óptico como el sistema EPIC o EnSpire que se pueden obtener de Corning y Perkin Elmer, respectivamente (remitirse también, p. ej., a Scatchard et ál. (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660 y las patentes estadounidenses n.º 5,283,173; 5,468,614 o el equivalente).

- En una modalidad, la afinidad de unión específica es alrededor de 2 veces mayor a la unión de referencia, alrededor de 5 veces mayor a la unión de referencia, alrededor de 10 veces mayor a la unión de referencia, alrededor de 20 veces mayor a la unión de referencia, alrededor de 50 veces mayor a la unión de referencia, alrededor de 100 veces mayor a la unión de referencia o alrededor de 1000 veces mayor a la unión de referencia o más.
- 10 En modalidades particulares, el dominio de unión extracelular de un CAR comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este. Un «anticuerpo» hace referencia a un agente de unión que es un polipéptido que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena
- 15 pesada que reconoce y se une de forma específica a un epítipo de un antígeno, como un péptido, un lípido, un polisacárido o un ácido nucleico con un determinante antigénico, como los reconocidos por una célula inmune.
- 20 Un «antígeno (Ag)» hace referencia a un compuesto, una composición o una sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de células T en un animal, incluidas composiciones (como una que incluya una proteína específica del cáncer) que se inyectan o absorben en un animal.

Un antígeno reacciona con los productos de la inmunidad celular o humoral específica, incluidos los inducidos por antígenos heterólogos, como los antígenos descritos. En modalidades particulares, el antígeno objetivo es un epítopo de un polipéptido de BCMA.

Un «epítopo» o «determinante antigénico» hace referencia a la región de un antígeno a la cual se une un agente de unión. Los epítopos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente se retienen al exponerse a solventes desnaturizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario típicamente se pierden al tratarse con solventes desnaturizantes. Un epítopo típicamente incluye al menos 3 y más normalmente al menos 5, alrededor de 9 o alrededor de 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

Los anticuerpos incluyen fragmentos de unión al antígeno de estos, como la Ig de camello, NAR Ig, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab)'₂, fragmentos F(ab)'₃, Fv, proteínas Fv de cadena simple («scFv»), bis-scFv (scFv)₂, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, proteínas

Fv estabilizadas con disulfuro («dsFv») y anticuerpo de dominio simple (sdAb, nanocuerpo) y partes de anticuerpos de longitud completa responsables de la unión de antígeno. El término también incluye formas genéticamente modificadas, como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados), anticuerpos heteroconjugados (como anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de unión al antígeno de estos. Remitirse también a Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3^a Ed., W. H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

Como comprenderá el experto en la técnica y como se describe en otros puntos en la presente, un anticuerpo completo comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena pesada consiste en una región variable y una primera, segunda y tercera región constante, mientras que cada cadena ligera consiste en una región variable y una región constante. Las cadenas pesadas de mamíferos se clasifican como α , δ , ϵ , γ y μ . Las cadenas ligeras de mamíferos se clasifican como λ o κ . Las inmunoglobulinas que comprenden las cadenas pesadas α , δ , ϵ , γ y μ se clasifican como inmunoglobulina (Ig)A, IgD, IgE, IgG e IgM. El anticuerpo completo forma una forma de «Y». El tallo de la Y consiste en la segunda y la tercera región constante (y, para IgE e IgM, la cuarta región constante) de dos cadenas pesadas

unidas entre sí y se forman uniones disulfuro (entre cadenas) en la bisagra. Las cadenas pesadas γ , α y δ tienen una región constante compuesta por tres dominios Ig dobles (en línea) y una región bisagra para mayor flexibilidad, las cadenas pesadas μ y ϵ tienen una región constante compuesta por cuatro dominios de inmunoglobulina. La segunda y tercera región constante se indican como «dominio CH2» y «dominio CH3», respectivamente. Cada brazo de la Y incluye la región variable y la primera región constante de una única cadena pesada unida a las regiones variable y constante de una única cadena ligera. Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada son responsables por la unión del antígeno.

Las regiones variables de cadena ligera y pesada contienen una región «marco» interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas «regiones determinantes de complementariedad» o «CDR» [por su sigla en inglés]. Las CDR se pueden definir o identificar con métodos convencionales, como mediante la secuencia según Kabat et ál (Wu, TT y Kabat, E. A., *J Exp Med.* 132(2):211-50, (1970); Borden, P. y Kabat E. A., *PNAS*, 84: 2440-2443 (1987); (remitirse a Kabat et ál., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Departamento de salud y servicios humanos de Estados Unidos 1991, que se incorpora a la presente mediante esta referencia) o mediante la

estructura según Chothia *et ál* (Choithia, C. y Lesk, A.M., *J Mol. Biol.*, 196(4): 901-917 (1987), Choithia, C. *et ál*, *Nature*, 342: 877 - 883 (1989)).

5 Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas se conservan de forma relativa dentro de una especie, como los seres humanos. La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas ligera y pesada que lo constituyen, sirven para
10 posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional. Las CDR son principalmente responsables de unirse a un epítopo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se indican de forma típica como CDR1, CDR2 y CDR3 y se numeran en secuencia a partir del extremo N. Asimismo, también se identifican típicamente
15 mediante la cadena en la que se ubica la CDR particular. Por lo tanto, las CDR ubicadas en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo se indican como CDRH1, CDRH2 y CDRH3, mientras que las CDR ubicadas en el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo se indican como CDRL1, CDRL2 y
20 CDRL3. Los anticuerpos con diferentes especificidades (es decir, diferentes lugares de combinación para diferentes antígenos) tienen diferentes CDR. Si bien la CDR es la que varía entre anticuerpos, solamente una cantidad limitada de posiciones de aminoácidos en las CDR se encuentra directamente

implicada en la unión del antígeno. Estas posiciones en las CDR se denominan residuos determinantes de especificidad (SDR, por su sigla en inglés). Los ejemplos ilustrativos de CDR de cadena ligera adecuadas para construir CAR de BCMA humanizados que se contemplan en la presente incluyen, de modo no taxativo, las secuencias de CDR que se indican en las SEQ ID NO: 1-3. Los ejemplos ilustrativos de CDR de cadena pesada adecuadas para construir CAR de BCMA humanizados que se contemplan en la presente incluyen, de modo no taxativo, las secuencias de CDR que se indican en las SEQ ID NO: 4-6.

Las referencias a «VH» o «VH» hacen referencia a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluidas la de un anticuerpo, Fv, scFv, dsFv, Fab u otro fragmento de anticuerpo descrito en la presente. Las referencias a «VL» o «VL» hacen referencia a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, incluidas la de un anticuerpo, Fv, scFv, dsFv, Fab u otro fragmento de anticuerpo descrito en la presente.

20

Un «anticuerpo monoclonal» es un anticuerpo producido mediante un único clon de linfocitos B o mediante una célula en la cual se transfectaron los genes de cadena ligera y pesada de un único anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen a

través de métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante realización de células formadoras de anticuerpos híbridos a partir de una fusión de células de mieloma con células inmunes del bazo. Los anticuerpos
5 monoclonales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados.

Un «anticuerpo quimérico» tiene residuos marco de una especie, como un ser humano, y CDR (que generalmente confieren unión al antígeno) de otra especie, como un ratón. En modalidades
10 preferidas particulares, un CAR contemplado en la presente comprende un dominio de unión específico del antígeno que es un anticuerpo quimérico o fragmento de unión al antígeno de este.

Un anticuerpo «humanizado» es una inmunoglobulina que incluye
15 una región marco humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, un ratón, una rata o sintética). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina «donante» y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se denomina «aceptora».

20

En modalidades particulares, un anticuerpo anti-BCMA de murino o fragmento de unión al antígeno de este incluye, de modo no taxativo, una IG de camello (un anticuerpo de camélido (VHH)), NAR de Ig, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab)'2,

fragmentos F(ab)'₃, Fv, anticuerpo Fv de cadena simple («scFv»), bis-scFv, (scFv)₂, minicuerpo, diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, proteína Fv estabilizada con disulfuro («dsFv») y anticuerpo de dominio simple (sdAb, nanocuerpo).

5

«Ig de camello» o «VHH de camélido», tal como se utilizan en la presente, hacen referencia a la unidad de unión al antígeno más pequeña conocida de un anticuerpo de cadena pesada (Koch-Nolte, *et ál*, FASEB J., 21: 3490-3498 (2007)). Un «anticuerpo de

10 cadena pesada» o un «anticuerpo camélido» hace referencia a un anticuerpo que contiene dos dominios VH y ninguna cadena ligera (Riechmann L. *et ál*, J. Immunol. Methods 231:25-38 (1999); WO94/04678; WO94/25591; patente estadounidense n.º 6,005,079).

15 «IgNAR» de «receptor de antígeno de nueva inmunoglobulina» hace referencia a una clase de anticuerpos del repertorio inmunológico de tiburón que consiste en homodímeros de dominio de receptor de antígeno nuevo variable (VNAR, por su sigla en inglés) y cinco dominios de receptores de antígeno nuevo

20 constante (CNAR, por su sigla en inglés). Los IgNAR representan algunos de los andamiajes de proteína a base de inmunoglobulina más pequeños conocidos y son altamente estables y poseen características de unión eficaz. La estabilidad inherente se puede atribuir tanto a (i) el andamiaje de Ig subyacente, que

presenta una cantidad considerable de residuos expuestos a la superficie hidrofílica y cargados en comparación con los dominios VH y VL del anticuerpo convencional que se encuentran en anticuerpos murinos, como a (ii) características

5 estructurales de estabilización en los bucles de la región determinante de complementariedad (CDR) que incluyen puentes disulfuro entre bucles, así como patrones de enlaces hidrógeno dentro de los bucles.

10 La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, denominados fragmentos «Fab», cada uno con un único lugar de unión al antígeno, y un fragmento «Fc» residual cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizarse fácilmente. El tratamiento con

15 pepsina proporciona un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos lugares de combinación con antígenos y aun así es capaz de reticular el antígeno.

«Fv» es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un lugar

20 de unión al antígeno completo. En una modalidad, una especie Fv de cadena doble consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en una asociación no covalente estrecha. En una especie Fv de cadena simple (scFv), un dominio variable de cadena ligera y uno de cadena pesada

pueden enlazarse de forma covalante mediante un enlazador peptídico flexible, de modo que las cadenas ligera y pesada puedan asociarse en una estructura «dimérica» análoga a la de una especie Fv de cadena doble. Es en esta configuración que
5 las tres regiones hipervariables (HVR) de cada dominio variable interactúan para definir un lugar de unión al antígeno en la superficie de dímero VH-VL. De forma colectiva, las seis HVR le confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. No obstante, incluso un único dominio variable (o la mitad de un
10 Fv que comprenda solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad menor a todo el lugar de unión.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena
15 pesada y de cadena ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de algunos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio de cadena pesada CH1 que incluyen
20 una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. En la presente, Fab'-SH es la designación para un Fab' en el que el o los residuos de cisteína de los dominios constantes presentan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' con

cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

El término «diacuerpos» hace referencia a fragmentos de anticuerpos con dos lugares de unión al antígeno. Tales fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptidos (VH-VL). Al utilizar un enlazador demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos lugares de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen de forma más completa, por ejemplo, en EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson *et ál.*, Nat. Med. 9:129-134 (2003) y Hollinger *et ál.*, PNAS USA 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson *et ál.*, Nat. Med. 9:129-134 (2003).

«Anticuerpo de dominio simple» o «sdAb» o «nanocuerpo» hacen referencia a un fragmento de anticuerpo que consiste en la región variable de una cadena pesada de anticuerpo (dominio VH) o la región variable de una cadena ligera de anticuerpo (dominio VL) (Holt, L., *et ál.*, Trends in Biotechnology, 21(11):

484:-490).

Los fragmentos de anticuerpo de «Fv de cadena simple» o «scFv» comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que
5 estos dominios se encuentran presentes en una única cadena de polipéptidos y en cualquier orientación (p. ej., VL-VH o VH-VL). Generalmente, el polipéptido scFv comprende además un enlace polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno.
10 Para acceder a un análisis de scFv, remitirse, p. ej., a Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, tomo 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York, 1994), págs. 269-315.

15 En modalidades preferidas, un CAR contemplado en la presente comprende un dominio de unión específico del antígeno que es un scFv murino. Los anticuerpos de cadena simple se pueden clonar a partir de los genes de la región V de un hibridoma específico para un objetivo deseado. La producción de dichos hibridomas se
20 ha vuelto habitual. Una técnica que se puede utilizar para clonar la cadena pesada de la región variable (VH) y la cadena ligera de la región variable (VL) se describió, por ejemplo, en Orlandi *et ál.*, *PNAS*, 1989; 86: 3833-3837.

En modalidades particulares, el dominio de unión específica al antígeno que es un scFv murino que se une a un polipéptido de BCMA humano. Los ejemplos ilustrativos de cadenas pesadas variables adecuadas para construir CAR de BCMA que se contemplan en la presente incluyen, de modo no taxativo, las secuencias de aminoácidos que se indican en la SEQ ID NO: 8. Los ejemplos ilustrativos de cadenas ligeras variables adecuadas para construir CAR de BCMA que se contemplan en la presente incluyen, de modo no taxativo, las secuencias de aminoácidos que se indican en la SEQ ID NO: 7.

Los dominios de unión específicos de BCMA que se brindan en la presente también comprenden una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR. Estas CDR pueden ser CDR no humanas o CDR no humanas alteradas seleccionadas de CDRL1, CDRL2 y CDRL3 de la cadena ligera y CDRH1, CDRH2 y CDRH3 de la cadena pesada. En determinadas modalidades, un dominio de unión específico de BCMA comprende (a) una región variable de cadena ligera que comprende una CDRL1 de cadena ligera, una CDRL2 de cadena ligera y una CDRL3 de cadena ligera y (b) una región variable de cadena pesada que comprende una CDRH1 de cadena pesada, una CDRH2 de cadena pesada y una CDRH3 de cadena pesada.

2. ENLAZADORES

En determinadas modalidades, los CAR contemplados en la presente pueden comprender residuos enlazadores entre los diversos dominios, p. ej., agregados para una separación y conformación correctas de la molécula. En modalidades
5 particulares, el enlazador es una secuencia de enlace de región variable. Una «secuencia de enlace de región variable» es una secuencia de aminoácidos que conecta los dominios V_H y V_L y brinda una función de separación compatible con la interacción de los dos sub-dominios de unión para que el polipéptido
10 resultante retenga una afinidad de unión específica con respecto a la misma molécula objetivo que un anticuerpo que comprenda las mismas regiones variables de cadena ligera y pesada. Los CAR contemplados en la presente pueden comprender uno, dos, tres, cuatro o cinco o más enlazadores. En
15 modalidades particulares, la longitud de un enlazador es de alrededor de 1 a alrededor de 25 aminoácidos, alrededor de 5 a alrededor de 20 aminoácidos o alrededor de 10 a alrededor de 20 aminoácidos o cualquier longitud intermedia de aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 1, 2,
20 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más aminoácidos.

Los ejemplos ilustrativos de enlazadores incluyen polímeros de glicina $(G)_n$, polímeros de glicina-serina $(G_{1-5}S_{1-5})_n$, donde n es

un entero de al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros enlazadores flexibles conocidos en la técnica. Los polímeros de glicina y glicina-serina son relativamente desestructurados y, por lo tanto, pueden tener la capacidad de servir como conector neutro entre dominios de proteínas de fusión, como los CAR descritos en la presente. La glicina accede al espacio phi-psi de forma más significativa incluso que la alanina y está mucho menos restringida que los residuos con cadenas laterales más largas (remitirse a Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173-142 (1992)). El experto en la técnica reconocerá que el diseño de un CAR en modalidades particulares puede incluir enlazadores completa o parcialmente flexibles, de modo que el enlazador puede incluir un enlazador flexible así como una o más partes que confieran una estructura menos flexible para brindar una estructura de CAR deseada.

Otros ejemplos de enlazadores incluyen, de modo no taxativo, las siguientes secuencias de aminoácidos: GGG; DGGGS (SEQ ID NO: 12); TGEKP (SEQ ID NO: 13) (remitirse, p. ej., a Liu *et al.*, PNAS 5525-5530 (1997)); GGRR (SEQ ID NO: 14) (Pomerantz *et al.* 1995, *supra*); (GGGGS)_n en la que n = 1, 2, 3, 4 o 5 (SEQ ID NO: 15) (Kim *et al.*, PNAS 93, 1156-1160 (1996.)); EGKSSGSGSESKVD (SEQ ID NO: 16) (Chaudhary *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci.

EUA 87:1066-1070); KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 17) (Bird *et al.*, 1988, *Science* 242:423-426), GGRRGGGS (SEQ ID NO: 18); LRQRDGERP (SEQ ID NO: 19); LRQKDGGGSERP (SEQ ID NO: 20); LRQKd(GGGS)₂ ERP (SEQ ID NO: 21). De forma alternativa, los
 5 enlazadores flexibles pueden diseñarse de forma racional utilizando un programa informático con capacidad para realizar un modelo tanto de los lugares de unión al ADN como de los péptidos en sí mismos (Desjarlais & Berg, *PNAS* 90:2256-2260 (1993), *PNAS* 91:11099-11103 (1994) o con métodos de expresión
 10 en fagos. En una modalidad, el enlazador comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 22) (Cooper *et al.*, *Blood*, 101(4): 1637-1644 (2003)).

3. DOMINIO SEPARADOR

15 En modalidades particulares, el dominio de unión del CAR está seguido por uno o más «dominios separadores», que hacen referencia a la región que mueve al dominio de unión al antígeno en sentido opuesto a la superficie de la célula efectora para permitir un contacto correcto entre las células,
 20 unión y activación del antígeno (Patel *et al.*, *Gene Therapy*, 1999; 6: 412:-419). El dominio bisagra puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. En determinadas modalidades, un dominio separador es una parte de una inmunoglobulina que incluye, de modo no taxativo, una o más

regiones constantes de cadena pesada, p. ej., CH2 y CH3. El dominio separador puede incluir la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de inmunoglobulina de origen natural o una región bisagra de inmunoglobulina alterada.

5

En una modalidad, el dominio separador comprende los dominios CH2 y CH3 de IgG1 o IgG4.

4. DOMINIO BISAGRA

10 El dominio de unión del CAR está seguido generalmente por uno o más «dominios bisagra», que tienen incidencia en la colocación del dominio de unión al antígeno en sentido opuesto a la superficie de la célula efectora para permitir un contacto correcto entre las células, unión y activación del antígeno. Un

15 CAR generalmente comprende uno o más dominios bisagra entre el dominio de unión y el dominio transmembrana (TM, por su sigla en inglés). El dominio bisagra puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. El dominio bisagra puede incluir la secuencia de aminoácidos de una región

20 bisagra de inmunoglobulina de origen natural o una región bisagra de inmunoglobulina alterada.

Una «región bisagra alterada» hace referencia a (a) una región bisagra de origen natural con hasta 30 % de cambios de

aminoácidos (p. ej., hasta 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de sustituciones o eliminaciones de aminoácidos), (b) una parte de una región bisagra de origen natural de al menos 10 aminoácidos (p. ej., al menos 12, 13, 14 o 15 aminoácidos) de longitud con

5 hasta 30 % de cambios de aminoácidos (p. ej., hasta 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de sustituciones o eliminaciones de aminoácidos) o (c) una parte de una región bisagra de origen natural que comprende la región bisagra núcleo (que puede tener una longitud de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 o al

10 menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos). En determinadas modalidades, uno o más residuos de cisteína en una región bisagra de inmunoglobulina de origen natural puede sustituirse con uno o más residuos de aminoácido adicionales (p. ej., uno o más residuos de serina). Una región bisagra de

15 inmunoglobulina alterada puede tener de forma alternativa o adicional un residuo de prolina de una región de inmunoglobulina de tipo salvaje sustituida con otro residuo de aminoácido (p. ej., un residuo de serina).

20 Otros dominios bisagra ilustrativos adecuados para uso en los CAR descritos en la presente incluyen la región bisagra derivada de las regiones extracelulares de proteínas de membrana tipo 1 como CD8 α , CD4, CD28 y CD7, que pueden ser regiones bisagra de tipo salvaje de estas moléculas o pueden

estar alteradas. En otra modalidad, el dominio bisagra comprende una región bisagra CD8 α .

5. DOMINIO TRANSMEMBRANA (TM)

5 El «dominio transmembrana» es la parte del CAR que fusiona la parte de unión extracelular y el dominio de señalización intracelular y fija el CAR a la membrana plasmática de la célula efectora inmune. El dominio TM puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. El

10 dominio TM se puede derivar (es decir, comprende al menos la o las regiones transmembrana de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154 y PD1. En una modalidad particular, el

15 dominio TM es sintético y comprende predominantemente residuos hidrofóbicos como leucina y valina.

En una modalidad, los CAR contemplados en la presente comprenden un dominio TM derivado de CD8 α . En otra modalidad,

20 un CAR contemplado en la presente comprende un dominio TM derivado de CD8 α y un enlazador oligo o polipeptídico corto, preferentemente de entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de longitud que enlaza el dominio TM y el dominio de señalización intracelular del CAR. Un enlazador basado en

glicina-serina brinda un enlazador particularmente adecuado.

6. DOMINIO DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR

En modalidades particulares, los CAR contemplados en la
5 presente comprenden un dominio de señalización intracelular. Un
«dominio de señalización intracelular» hace referencia a la
parte de un CAR que participa en la transducción del mensaje de
unión eficaz del CAR de BCMA a un polipéptido de BCMA humano en
el interior de la célula efectora inmune para provocar una
10 función de la célula efectora, p. ej., activación, producción
de citocinas, proliferación y actividad citotóxica, incluida la
liberación de factores citotóxicos de la célula objetivo unida
al CAR u otras respuestas celulares provocadas por la unión del
antígeno al dominio CAR extracelular.

15

El término «función efectora» hace referencia a una función
especializada de una célula efectora inmune. La función
efectora de la célula T, por ejemplo, puede ser actividad
citolítica o auxiliar o actividad que incluye la secreción de
20 citocinas. Por lo tanto, el término «dominio de señalización
intracelular» hace referencia a la parte de una proteína que
transduce la señal de función efectora y dirige la célula para
que realice una función especializada. Si bien generalmente se
puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en

muchos casos no es necesario utilizar todo el dominio. En la medida en que se utilice una parte trunca de un dominio de señalización intracelular, dicha parte trunca se puede utilizar en lugar de todo el dominio, siempre que transduzca la señal de función efectora. El término dominio de señalización intracelular pretende incluir cualquier parte trunca del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de función efectora.

Se sabe que las señales generadas a través del TCR solamente no son suficientes para una activación completa de la célula T y que también se requiere una señal secundaria o coestimuladora. Por lo tanto, se puede decir que la activación de células T está medida por dos clases distintas de dominios de señalización intracelular: dominios de señalización primaria que inician la activación primaria dependiente del antígeno a través del TCR (p. ej., un complejo TCR/CD3) y dominios de señalización coestimuladora que actúan de forma independiente del antígeno para brindar una señal coestimuladora secundaria.

En modalidades preferidas, un CAR contemplado en la presente comprende un dominio de señalización intracelular que comprende uno o más «dominios de señalización coestimuladora» y un «dominio de señalización primaria».

Los dominios de señalización primaria regulan la activación primaria del complejo de TCR de forma estimuladora o de forma inhibidora. Los dominios de señalización primaria que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación en base a tirosina del inmunorreceptor o ITAM [por su sigla en inglés].

Los ejemplos ilustrativos de ITAM con dominios de señalización primaria de uso particular en la invención incluyen los derivados de TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En modalidades preferidas particulares, un CAR comprende un dominio de señalización primaria CD3 ζ y uno o más dominios de señalización coestimuladora. Los dominios de señalización coestimuladora y señalización primaria intracelular se pueden enlazar en cualquier orden en tándem con el extremo carboxilo del dominio transmembrana.

Los CAR contemplados en la presente comprenden uno o más dominios de señalización coestimuladora para potenciar la eficacia y la expansión de las células T que expresan receptores CAR. Tal como se utiliza en la presente, el término «dominio de señalización coestimuladora» o «dominio coestimulador» hace referencia a un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora. Las moléculas

coestimuladoras son moléculas de la superficie celular distintas a los receptores de antígenos o receptores Fc que brindan una segunda señal necesaria para una activación y función eficaces de los linfocitos T tras la unión al antígeno.

5 Los ejemplos ilustrativos de estas moléculas coestimuladoras incluyen CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM y ZAP70. En
10 una modalidad, un CAR comprende uno o más dominios de señalización coestimuladores seleccionados del grupo que consiste en CD28, CD137 y CD134 y un dominio de señalización primaria CD3ζ.

15 En otra modalidad, un CAR comprende dominios de señalización coestimuladora CD28 y CD137 y un dominio de señalización primaria CD3ζ.

En aun otra modalidad, un CAR comprende dominios de
20 señalización coestimuladora CD28 y CD134 y un dominio de señalización primaria CD3ζ.

En una modalidad, un CAR comprende dominios de señalización coestimuladora CD137 y CD134 y un dominio de señalización

primaria CD3ζ.

En modalidades particulares, los CAR contemplados en la presente comprenden un anticuerpo anti-BCMA de murino o
 5 fragmento de unión al antígeno de este que se une de forma específica a un polipéptido de BCMA expresado en células B.

En una modalidad, un CAR comprende un scFv anti-BCMA de murino que se une a un polipéptido de BCMA, un dominio transmembrana
 10 derivado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154 y PD1 y uno o más dominios de señalización coestimuladora
 15 intracelulares de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM
 20 y ZAP70 y un dominio de señalización primaria de TCRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ, CD22, CD79a, CD79b y CD66d.

En una modalidad, un CAR comprende un scFv anti-BCMA de murino que se une a un polipéptido de BCMA, un dominio bisagra

seleccionado del grupo que consiste en: bisagra de IgG1/CH2/CH3, bisagra de IgG4/CH2/CH3 y una bisagra CD8 α , un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154 y PD1 y uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelulares de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM y ZAP70 y un dominio de señalización primaria de TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b y CD66d.

En una modalidad, un CAR comprende un scFv anti-BCMA de murino que se une a un polipéptido de BCMA, un dominio bisagra seleccionado del grupo que consiste en: bisagra de IgG1/CH2/CH3, bisagra de IgG4/CH2/CH3 y una bisagra CD8 α , un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134,

CD137, CD152, CD 154 y PD1, un enlazador oligo o polipeptídico corto, de preferentemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de longitud que enlace el dominio TM con el dominio de señalización intracelular del CAR y uno o más dominios de
 5 señalización coestimuladora intracelulares de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278
 10 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM y ZAP70 y un dominio de señalización primaria de TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b y CD66d.

En una modalidad particular, un CAR comprende un scFc anti-BCMA
 15 de murino que se une a un polipéptido de BCMA, un dominio bisagra que comprende una bisagra de IgG1/polipéptido CH2/CH3 y un polipéptido CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α que comprende un enlazador polipeptídico de alrededor de 3 a alrededor de 10 aminoácidos, un domino de señalización
 20 coestimuladora intracelular CD137 y un dominio de señalización primaria CD3 ζ .

En una modalidad particular, un CAR comprende un scFc anti-BCMA de murino que se une a un polipéptido de BCMA, un dominio

bisagra que comprende un polipéptido CD8 α , un dominio transmembrana CD8 α que comprende un enlazador polipeptídico de alrededor de 3 a alrededor de 10 aminoácidos, un dominio de señalización coestimuladora intracelular CD134 y un dominio de
5 señalización primaria CD3 ζ .

En una modalidad particular, un CAR comprende un scFc anti-BCMA de murino que se une a un polipéptido de BCMA, un dominio bisagra que comprende un polipéptido CD8 α , un dominio
10 transmembrana CD8 α que comprende un enlazador polipeptídico de alrededor de 3 a alrededor de 10 aminoácidos, un dominio de señalización coestimuladora intracelular CD28 y un dominio de señalización primaria CD3 ζ .

15 Asimismo, el diseño de los CAR contemplados en la presente permite una mejor expansión, persistencia a largo plazo y propiedades citotóxicas tolerables en las células T que expresan los CAR en comparación con las células T no modificadas o las células T modificadas para expresar otros
20 CAR.

D. POLIPÉPTIDOS

La presente invención contempla, en parte, polipéptidos de CAR y fragmentos de estos, células y composiciones que los

comprenden y vectores que expresan polipéptidos. En modalidades preferidas, se brinda un polipéptido que comprende uno o más CAR como se indica en la SEQ ID NO: 9.

5 «Polipéptido», «fragmento de polipéptido», «péptido» y «proteína» se utilizan de forma intercambiable, salvo que se especifique lo contrario y según su significado convencional, es decir, como una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos no se limitan a una longitud específica, p. ej., pueden
10 comprender una secuencia de proteínas de longitud completa o un fragmento de una proteína de longitud completa y pueden incluir modificaciones postraducción del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de
15 origen natural como no natural. En diversas modalidades, los polipéptidos CAR contemplados en la presente comprenden una secuencia señal (o líder) en el extremo N terminal de la proteína, que dirige de forma conjunta o posterior a la traducción la transferencia de la proteína. Los ejemplos
20 ilustrativos de secuencias de señal adecuadas útiles en los CAR descritos en la presente incluyen, de modo no taxativo, la secuencia señal de cadena pesada de IgG1 y la secuencia señal CD8 α . Los polipéptidos se pueden preparar utilizando cualquiera de diversas técnicas recombinantes y/o sintéticas conocidas.

Los polipéptidos contemplados en la presente comprenden de forma específica los CAR de la presente descripción o secuencias con eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de un CAR como se describe en la
5 presente.

Un «péptido aislado» o un «polipéptido aislado» y similares, tal como se utilizan en la presente, hacen referencia a aislamiento y/o purificación *in vitro* de una molécula de
10 péptido o polipéptido de un entorno celular y de asociación con otros componentes de la célula, es decir, no asociada de forma significativa con sustancias *in vivo*. De forma similar, una «célula aislada» hace referencia a una célula que se obtuvo de un tejido u órgano *in vivo* y se encuentra sustancialmente libre
15 de matriz extracelular.

Los polipéptidos incluyen «variantes de polipéptidos». Las variantes de polipéptidos pueden diferir de un polipéptido de origen natural en una o más sustituciones, eliminaciones,
20 adiciones y/o inserciones. Estas variantes pueden ser de origen natural o pueden generarse de forma sintética, por ejemplo, modificando una o más de las secuencias polipeptídicas anteriores. Por ejemplo, en modalidades particulares, puede resultar deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras

propiedades biológicas de los CAR introduciendo una o más sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones en un dominio de unión, bisagra, dominio TM, dominio de señalización coestimuladora o dominio de señalización primaria de un polipéptido de CAR. Preferentemente, los polipéptidos de la invención incluyen polipéptidos con al menos alrededor de 65 %, 70 %, 75 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad de aminoácidos con estos.

Los polipéptidos incluyen «fragmentos de polipéptidos». Los fragmentos de polipéptidos hacen referencia a un polipéptido, que puede ser monomérico o multimérico, con una eliminación amino-terminal, una eliminación carboxilo-terminal y/o una eliminación o sustitución interna de un polipéptido de origen natural o producido de forma recombinante. En determinadas modalidades, un fragmento de polipéptido puede comprender una cadena de aminoácidos de al menos 5 a alrededor de 500 aminoácidos de longitud. Se observará que, en determinadas modalidades, los fragmentos tienen una longitud de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 450 aminoácidos. Los fragmentos de polipéptido particularmente

útiles incluyen dominios funcionales, incluidos dominios de unión de anticuerpo o fragmentos de anticuerpos. En el caso de un anticuerpo anti-BCMA de murino, los fragmentos útiles incluyen, de modo no taxativo: una región CDR, una región CDR3
5 de la cadena pesada o ligera, una región variable de una cadena pesada o ligera, una parte de una cadena de anticuerpos o región variable, incluidas dos CDR y similares.

El polipéptido también se puede fusionar en marco o conjugarse
10 con un enlazador u otra secuencia para una mayor facilidad de síntesis, purificación o identificación del polipéptido (p. ej., poli-His) o para potenciar la unión del polipéptido a un soporte sólido.

15 Tal como se indicó anteriormente, los polipéptidos de la invención se pueden alterar de diversas formas, incluidas sustituciones, eliminaciones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. En la técnica se conocen en términos generales métodos para dichas manipulaciones. Por ejemplo, se pueden
20 preparar variantes de secuencias de aminoácidos de un polipéptido de referencia mediante mutaciones en el ADN. En la técnica se conocen métodos para alteraciones de secuencias de nucleótidos y mutagénesis. Remitirse, por ejemplo, a Kunkel (1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*. 82: 488-492), Kunkel et ál.,

(1987, *Methods in Enzymol*, 154: 367-382), patente estadounidense n.º 4,873,192, Watson, J. D. et ál., (*Molecular Biology of the Gene*, cuarta edición, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) y las referencias que allí se citan. Se
5 pueden encontrar lineamientos en cuanto a las sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan la actividad biológica de la proteína de interés en el modelo de Dayhoff et ál., (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.).

10

En determinadas modalidades, una variante contendrá sustituciones conservadoras. Una «sustitución conservadora» es una en la que un aminoácido sustituye otro aminoácido con propiedades similares, de modo que el experto en la técnica de
15 la química peptídica esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido se encontraran sustancialmente inalteradas. Se pueden realizar modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención y aun así obtener una molécula funcional que
20 codifique un polipéptido variante o derivado con características deseables. Cuando se desee alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido para crear un polipéptido variante equivalente o incluso mejorado de la invención, el experto en la técnica, por ejemplo, puede cambiar uno o más de

los codones de la secuencia de ADN de codificación, p. ej., de acuerdo con la tabla 1.

TABLA 1 -Codones de aminoácido

5

10

15

20

Aminoácidos	Código de una letra	Código de tres letras	Codones					
Alanina	A	Ala	GCA	GCC	GCG	GCU		
Cisteína	C	Cys	UGC	UGU				
Ácido aspártico	D	Asp	GAC	GAU				
Ácido glutámico	E	Glu	GAA	GAG				
Fenilalanina	F	Phe	UUC	UUU				
Glicina	G	Gly	GGA	GGC	GGG	GGU		
Histidina	H	His	CAC	CAU				
Isoleucina	I	Iso	AUA	AUC	AUU			
Lisina	K	Lys	AAA	AAG				
Leucina	L	Leu	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Metionina	M	Met	AUG					

5	Asparagina	N	Asn	AAC	AAU				
	Prolina	P	Pro	CCA	CCC	CCG	CCU		
	Glutamina	Q	Gln	CAA	CAG				
	Arginina	R	Arg	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
	Serina	S	Ser	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
	Treonina	T	Thr	ACA	ACC	ACG	ACU		
	Valina	V	Val	GUA	GUC	GUG	GUU		
10	Triptófano	W	Trp	UGG					
	Tiosina	Y	Tyr	UAC	UAU				

Los lineamientos para determinar qué residuos de aminoácidos pueden sustituirse, insertarse o eliminarse sin eliminar la actividad biológica o inmunológica pueden encontrarse utilizando programas informáticos conocidos en la técnica, como el software DNASTAR™. Preferentemente, los cambios de aminoácidos en las variantes de proteínas que se describen en la presente son cambios de aminoácidos conservadores, es decir, sustituciones de aminoácidos con carga o sin carga similar. Un cambio de aminoácido conservador implica sustitución de uno de una familia de aminoácidos relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos de origen natural se dividen generalmente en cuatro familias: aminoácidos ácidos (aspartato,

glutamato), básicos (lisina, arginina, histidina), no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) y sin carga polar (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). Fenilalanina, triptófano y tirosina se clasifican algunas veces de forma conjunta como aminoácidos aromáticos. En un péptido o una proteína, los expertos en la técnica conocen las sustituciones conservadoras de aminoácidos adecuadas y estas generalmente se pueden realizar sin alterar una actividad biológica de una molécula resultante. Los expertos en la técnica reconocen que, en general, las sustituciones de un único aminoácido en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran la actividad biológica de forma sustancial (remitirse, p. ej., a Watson et ál. *Molecular Biology of the Gene*, 4ª edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p.224). Los ejemplos de sustituciones conservadoras se describen en la solicitud de patente estadounidense n.º 61/241,647, cuya descripción se incorpora a la presente mediante esta referencia.

En la realización de estos cambios, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. En la técnica se comprende la importancia del índice hidropático de los aminoácidos en la adjudicación de la función biológica interactiva a una proteína (Kyte y Doolittle, 1982, incorporado

a la presente mediante esta referencia). A cada aminoácido se le asignó un índice hidropático según sus características de carga e hidrofobicidad (Kyte y Doolittle, 1982). Estos valores son: isoleucina (+4.5), valina (+4.2), leucina (+3.8),
5 fenilalanina (+2.8), cisteína/cisteína (+2.5), metionina (+1.9), alanina (+1.8), glicina (-0.4), treonina (-0.7), serina (-0.8), triptófano (-0.9), tirosina (-1.3), prolina (-1.6), histidina (-3.2), glutamato (-3.5), glutamina (-3.5), aspartato (-3.5), asparagina (-3.5), lisina (-3.9) y arginina (-4.5).

10

En la técnica se sabe que determinados aminoácidos se pueden sustituir con otros aminoácidos con un valor o índice hidropático similar y aun así producir una proteína con actividad biológica similar, es decir, aun así obtener una
15 proteína biológica equivalente a nivel funcional. En la realización de dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos se encuentren dentro de ± 2 , se prefieren particularmente aquellos dentro de ± 1 y se prefieren incluso más particularmente aquellos dentro de ± 0.5 .
20 También se comprende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse de forma eficaz según la hidrofiliidad.

Tal como se detalla en la patente estadounidense n.º 4,554,101,

se han asignado los siguientes valores de hidrofiliicidad a los
residuos de aminoácidos: arginina (+3.0), lisina (+3.0),
aspartato (+3.0 $\pm$ 1), glutamato (+3.0 $\pm$ 1), serina (+0.3),
asparagina (+0.2), glutamina (+0.2), glicina (0), treonina (-
5 0.4), prolina (-0.5 $\pm$ 1), alanina (-0.5), histidina (-0.5),
cisteína (-1.0), metionina (-1.3), valina (-1.5), leucina (-
1.8), isoleucina (-1.8), tirosina (-2.3), fenilalanina (-2.5),
triptófano (-3.4). Se comprende que un aminoácido puede
sustituir otro con un valor de hidrofiliicidad similar y aun así
10 obtener una proteína biológicamente equivalente y, en
particular, una inmunológicamente equivalente. En dichos
cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos
valores de hidrofiliicidad se encuentren dentro de ± 2 , se
prefieren particularmente aquellos dentro de ± 1 y se prefieren
15 incluso más particularmente aquellos dentro de ± 0.5 .

Tal como se indicó anteriormente, las sustituciones de
aminoácidos se pueden basar en la similitud relativa de los
sustituyentes de cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su
20 hidrofobicidad, hidrofiliicidad, carga, tamaño y similares.

Las variantes de polipéptidos también incluyen formas
glicosiladas, conjugados acumulativos con otras moléculas y
conjugados covalentes con restos químicos no relacionados (p.

ej., moléculas pegiladas). Las variantes covalentes se pueden preparar enlazando funcionalidades con grupos que se encuentran en la cadena de aminoácidos o en el residuo de extremo N o C, como se conoce en la técnica. Las variantes también incluyen
5 variantes alélicas, variantes de especie y muteínas. Los truncamientos o las eliminaciones de regiones que no afectan la actividad funcional de las proteínas también son variantes.

En una modalidad, cuando se desea la expresión de dos o más
10 polipéptidos, las secuencias de polinucleótidos que los codifican se pueden separar mediante y secuencia IRES, como se describe en otro punto en la presente. En otra modalidad, se pueden expresar dos o más polipéptidos como una proteína de fusión que comprende una o más secuencias de polipéptidos de
15 autoescisión.

Los polipéptidos de la presente invención incluyen polipéptidos de fusión. En modalidades preferidas, se brindan polipéptidos de fusión y polinucleótidos que codifican polipéptidos de
20 fusión, p. ej., CAR. Los polipéptidos de fusión y las proteínas de fusión hacen referencia a un polipéptido con al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez o más segmentos de polipéptidos. Los polipéptidos de fusión son típicamente de extremo C ligados a extremo N, si bien también

pueden ser de extremo C ligado a extremo C, extremo N a extremo N o extremo N a extremo C. Los polipéptidos de la proteína de fusión pueden encontrarse en cualquier orden o en un orden específico. Los polipéptidos de fusión o las proteínas de fusión también pueden incluir variantes modificadas de forma conservadora, variantes polimórficas, alelos, mutantes, subsecuencias y homólogos entre especies, siempre que se conserve la actividad de transcripción deseada del polipéptido de fusión. Los polipéptidos de fusión se pueden producir con métodos sintéticos químicos o mediante enlace químico entre los dos restos o pueden prepararse generalmente utilizando otras técnicas estándar. Las secuencias de ADN ligadas que comprenden el polipéptido de fusión se enlazan de forma operativa a elementos de control de traducción o transcripción adecuados como se indica en otro punto en la presente.

En una modalidad, un compañero de fusión comprende una secuencia que ayuda en la expresión de la proteína (un potenciador de expresión) con mayores rendimientos que la proteína recombinante natural. Se pueden seleccionar otros compañeros de fusión para aumentar la solubilidad de la proteína o para permitir el direccionamiento de la proteína hacia compartimientos intracelulares deseados o para facilitar el transporte de la proteína de fusión a través de la membrana

celular.

Los polipéptidos de fusión también pueden comprender una señal de escisión de polipéptidos entre cada uno de los dominios de polipéptidos descritos en la presente. Asimismo, el lugar del polipéptido se puede colocar en cualquier secuencia peptídica del enlazador. Los ejemplos de señales de escisión de polipéptidos incluyen lugares de reconocimiento de escisión de polipéptidos como lugares de escisión de proteasa, lugares de escisión de nucleasa (p. ej., lugares de reconocimiento de enzimas de restricción raras, lugares de reconocimiento de ribozima de autoescisión) y oligopéptidos virales de autoescisión (remitirse a deFelipe y Ryan, 2004. *Traffic*, 5(8); 616-26).

15

El experto en la técnica conoce lugares de escisión de proteasa y péptidos de autoescisión adecuados (remitirse, p. ej., a Ryan et ál., 1997. *J. Gener. Virol.* 78, 699-722; Scymczak et ál. (2004) *Nature Biotech.* 5, 589-594). Los ejemplos de lugares de escisión de proteasa incluyen, de modo no taxativo, lugares de escisión de proteasas NIa de potivirus (p. ej., proteasa del virus del grabado del tabaco), proteasas HC de potivirus, proteasas P1 de potivirus (P35), proteasas NIa de biovirus, proteasas codificadas por ARN-2 biovirus, proteasas de

20

aftovirus L, proteasas de enterovirus 2A, proteasas de rinovirus 2A, proteasas de picorna 3C, proteasas de comovirus 24K, proteasas de nepovirus 24K, proteasa tipo 3C de RTSV (virus esférico del tungro del arroz), proteasa tipo 3C de PYVF (virus del moteado amarillo del rábano), heparina, trombina, factor Xa y enterocinasa. Debido a su gran rigor de escisión, en una modalidad se prefieren lugares de escisión de proteasa de TEV (virus del grabado del tabaco), p. ej., EXXYXQ(G/S) (SEQ ID NO: 23), por ejemplo, ENLYFQG (SEQ ID NO: 24) y ENLYFQS (SEQ ID NO: 25), en la que X representa cualquier aminoácido (la escisión mediante TEV se produce entre Q y G o Q y S).

En una modalidad particular, los péptidos de autoescisión incluyen las secuencias de polipéptidos obtenidas de péptidos de cardiovirus 2A y potivirus, FMDV (virus de fiebre aftosa), virus de rinitis equina A, virus de Thosa asigna y tescovirus porcino.

En determinadas modalidades, el lugar de polipéptidos de autoescisión comprende un lugar, una secuencia o un dominio de 2A o tipo 2A (Donnelly et ál., 2001. *J. Gen. Virol.* 82:1027-1041).

TABLA 2: Los ejemplos de lugares 2A incluyen las siguientes

secuencias:

5	SEQ ID NO: 26	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
	SEQ ID NO: 27	TLNFDLLKLAGDVESNPGP
	SEQ ID NO: 28	LLKLAGDVESNPGP
	SEQ ID NO: 29	NFDLLKLAGDVESNPGP
	SEQ ID NO: 30	QLLNFDLLKLAGDVESNPGP
	SEQ ID NO: 31	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
10	SEQ ID NO: 32	VTELLYRMKRAETYCPRLAIHPTEARHKQKIVAPVKQT
	SEQ ID NO: 33	LNFDLLKLAGDVESNPGP
	SEQ ID NO: 34	LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
	SEQ ID NO: 35	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

15 En modalidades preferidas, un polipéptido contemplado en la presente comprende un polipéptido de CAR.

E. POLINUCLEÓTIDOS

En modalidades preferidas, se brinda un polinucleótido que
 20 codifica uno o más polipéptidos, p. ej., la SEQ ID NO: 10. Tal como se utilizan en la presente, los términos «polinucleótido» o «ácido nucleico» hacen referencia a ARN mensajero (ARNm), ARN, ARN genómico (ARNg), ARN de cadena positiva (ARN(+)), ARN de cadena negativa (ARN(-)), ADN genómico (ADNg), ADN

complementario (ADNc) o ADN recombinante. Los polinucleótidos incluyen polinucleótidos de cadena simple o doble. Preferentemente, los polinucleótidos de la invención incluyen polinucleótidos o variantes con al menos alrededor de 50 %, 55
5 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de referencia descritas en la presente (remitirse, p. ej., al listado de secuencias), típicamente donde la variante mantiene al menos una actividad biológica de
10 la secuencia de referencia. En diversas modalidades ilustrativas, la presente invención contempla, en parte, polinucleótidos que comprenden vectores de expresión, vectores virales y plásmidos de transferencia y composiciones y células que los comprenden.

15

En modalidades particulares, la presente invención brinda polinucleótidos que codifican al menos alrededor de 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 1000, 1250, 1500, 1750 o 2000 o más residuos de aminoácidos contiguos de un
20 polipéptido de la invención, así como todas las longitudes intermedias. Se comprenderá fácilmente que «longitudes intermedias» en este contexto significa cualquier longitud entre los valores indicados, como 6, 7, 8, 9, *etc.*, 101, 102, 103, *etc.*; 151, 152, 153, *etc.*; 201, 202, 203, *etc.*

Tal como se utilizan en la presente, los términos «variante de polinucleótido» y «variante» y los similares hacen referencia a polinucleótidos que presentan una identidad de secuencia
5 sustancial con respecto a una secuencia de polinucleótido de referencia o polinucleótidos que se hibridan con una secuencia de referencia en condiciones rigurosas que se definen a continuación. Estos términos incluyen polinucleótidos en los que se agregaron o eliminaron uno o más nucleótidos o se
10 remplazaron con diferentes nucleótidos en comparación con un polinucleótido de referencia. En este sentido, se comprende en la técnica que se pueden realizar determinadas alteraciones que incluyen mutaciones, adiciones, eliminaciones y sustituciones en un polinucleótido de referencia, con las cuales el
15 polinucleótido alterado retiene la función o actividad biológica del polinucleótido de referencia.

Las menciones de «identidad de secuencia» o, por ejemplo, que comprenden «secuencia 50 % idéntica a», tal como se utilizan en
20 la presente, hacen referencia a la medida en la que las secuencias son idénticas nucleótido por nucleótido o aminoácido por aminoácido en un espectro de comparación. Por lo tanto, un «porcentaje de identidad de secuencia» se puede calcular comparando dos secuencias alineadas de manera óptima en el

espectro de comparación, determinando la cantidad de posiciones en las cuales se produce la base de ácidos nucleicos idénticos (p. ej., A, T, C, G, I) o el residuo de aminoácidos idéntico (p. ej., Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) en ambas secuencias para proporcionar la cantidad de posiciones emparejadas, dividiendo la cantidad de posiciones emparejadas entre la cantidad total de posiciones en el espectro de comparación (es decir, el tamaño del espectro) y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. Se incluyen nucleótidos y polipéptidos con al menos alrededor de 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de referencia descritas en la presente, típicamente donde la variante de polipéptido mantiene al menos una actividad biológica de la secuencia de referencia.

Los términos que se utilizan para describir relaciones de secuencias entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen «secuencia de referencia», «espectro de comparación», «identidad de secuencia», «porcentaje de identidad de secuencia» e «identidad sustancial». Una «secuencia de referencia» tiene al menos 12, pero frecuentemente 15 a 18 y a

menudo al menos 25 unidades monoméricas e incluye nucleótidos y residuos de aminoácidos en su longitud. Debido a que dos polinucleótidos pueden comprender cada (1) una secuencia (es decir, solamente una parte de la secuencia de polinucleótidos completa) similar entre los dos nucleótidos y (2) una secuencia divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencia entre dos (o más) polinucleótidos se realizan típicamente comparando secuencias de los dos polinucleótidos en un «espectro de comparación» para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Un «espectro de comparación» hace referencia a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, normalmente alrededor de 50 a alrededor de 100, más normalmente alrededor de 100 a alrededor de 150, en las cuales una secuencia se compara con una secuencia de referencia con la misma cantidad de posiciones contiguas luego de haber alineado las dos secuencias de manera óptima. El espectro de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) de alrededor de 20 % o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencia para alineación de un espectro de comparación puede realizarse mediante implementaciones computarizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics

edición 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive
Madison, WI, EUA) o mediante inspección y la mejor alineación
(es decir, que produce el mayor porcentaje de homología en el
espectro de comparación) que se genera mediante cualquiera de
5 los métodos seleccionados. También se puede hacer referencia a
la familia BLAST de programas, por ejemplo, como se describe en
Altschul *et ál.*, 1997, *Nucl. Acids Res.* 25:3389. Se puede
encontrar una mención detallada del análisis de secuencia en la
unidad 19.3 de Ausubel *et ál.*, *Current Protocols in Molecular*
10 *Biology*, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, capítulo 15.

Tal como se utiliza en la presente, «polinucleótido aislado»
hace referencia a un polinucleótido purificado a partir de las
secuencias que lo flanquean en un estado natural, p. ej., un
15 fragmento de ADN eliminado de las secuencias normalmente
adyacentes al fragmento. Un «polinucleótido aislado» también
hace referencia a un ADN complementario (ADNc), un ADN
recombinante u otro polinucleótido que no existe en la
naturaleza y que se realizó manualmente.

20

Los términos que describen la orientación de los
polinucleótidos incluyen: 5' (normalmente el extremo del
polinucleótido con un grupo fosfato libre) y 3' (normalmente el
extremo del polinucleótido con un grupo hidroxilo (OH) libre).

Las secuencias de polinucleótidos se pueden anotar en la orientación 5' a 3' o en la orientación 3' a 5'. Para el ADN y el ARNm, la cadena 5' a 3' se indica como la cadena «sentido», «más» o «de codificación» debido a que su secuencia es idéntica a la secuencial del premensajero (ARN_{prem}) [salvo por uracilo (U) en el ARN, en lugar de timina (T) en el ADN]. Para el ADN y el ARNm, la cadena 3' a 5' complementaria que es la cadena transcripta por la ARN polimerasa se indica como cadena «plantilla», «antisentido», «menos» o «no codificante». Tal como se utiliza en la presente, el término «orientación inversa» hace referencia a una secuencia 5' a 3' escrita en la orientación 3' a 5' o una secuencia 3' a 5' escrita en la orientación 5' a 3'.

Los términos «complementario» y «complementariedad» se refieren a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las normas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, la cadena complementaria de la secuencia de ADN 5' A G T C A T G 3' es 3' T C A G T A C 5'. La última secuencia a menudo se escribe como el complemento inverso con el extremo 5' a la izquierda y el extremo 3' a la derecha, 5' C A T G A C T 3'. Una secuencia igual a su complemento inverso se dice que es una secuencia palindrómica. La complementariedad puede ser «parcial», en la que solo algunas de las bases de ácidos

nucleicos se emparejan de acuerdo con las normas de emparejamiento de bases. O puede haber complementariedad «completa» o «total» entre los ácidos nucleicos.

5 Asimismo, los expertos en la técnica observarán que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido o fragmento de variante de este, tal como se describe en la presente. Algunos de estos polinucleótidos poseen una homología
10 mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen natural. No obstante, los polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codones están contemplados específicamente en la presente invención, por ejemplo, los polinucleótidos optimizados para la selección de codones
15 humanos y/o de primates. Asimismo, también se pueden utilizar alelos de los genes que comprendan las secuencias de polinucleótidos que se brindan en la presente. Los alelos son genes endógenos alterados como resultado de una o más mutaciones, como eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de
20 nucleótidos.

El término «casete de ácido nucleico», tal como se utiliza en la presente, hace referencia a secuencias genéticas dentro de un vector que pueda expresar un ARN y, posteriormente, una

proteína. El casete de ácido nucleico contiene el gen de interés, p. ej., un CAR. El casete de ácido nucleico se orienta, en su posición y secuencia, dentro del vector de modo que el ácido nucleico en el casete se pueda transcribir hacia el ARN y, cuando sea necesario, traducirse en una proteína o un polipéptido y experimentar modificaciones postraduccionales adecuadas necesarias para la actividad en la célula transformada y translocalizarse hacia el compartimiento adecuado para la actividad biológica, dirigiéndose hacia los compartimientos intracelulares adecuados o mediante secreción en compartimientos extracelulares. Preferentemente, el casete tiene sus extremos 3' y 5' adaptados para fácil inserción en un vector, p. ej., tiene lugares de restricción de endonucleasa en cada extremo. En una modalidad preferida de la invención, el casete de ácido nucleico contiene la secuencia de un receptor de antígeno quimérico que se utiliza para tratar una neoplasia de células B. El casete se puede retirar e insertar en un vector plásmido o viral como una única unidad.

En modalidades particulares, los polinucleótidos incluyen al menos un polinucleótido de interés. Tal como se utiliza en la presente, el término «polinucleótido de interés» hace referencia a un polinucleótido que codifica un polipéptido (es decir, un polipéptido de interés) que se inserta en un vector

de expresión que se desea expresar. Un vector puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 polinucleótidos de interés. En determinadas modalidades, el polinucleótido de interés codifica un polipéptido que brinda un efecto terapéutico en el

5 tratamiento o la prevención de una enfermedad o un trastorno. Los polinucleótidos de interés y los polipéptidos que se codifican a partir de estos incluyen tanto polinucleótidos que codifican polipéptidos de tipo salvaje, como variantes funciones y fragmentos de estos. En modalidades particulares,

10 una variante funcional tiene al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % de identidad con un polinucleótido de referencia o una secuencia de polipéptidos de tipo salvaje correspondientes. En determinadas modalidades, una variante funcional o fragmento tiene al menos 50 %, al menos 60 %, al

15 menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 % de una actividad biológica de un polipéptido de tipo salvaje correspondiente.

En una modalidad, el polinucleótido de interés no codifica un polipéptido sino que sirve como plantilla para transcribir

20 miARN, ARNip o ARNhc, ribozimas u otro ARN inhibidor. En otras diversas modalidades, un polinucleótido comprende un polinucleótido de interés que codifica un CAR y uno o más polinucleótidos de interés adicionales que incluyen, de modo no taxativo, una secuencia de ácido nucleico inhibidora que

incluye, de modo no taxativo: un ARNip, un miARN, un ARNhc y un ribozima.

Tal como se utilizan en la presente, los términos «ARNip» o
5 «ARN interferente pequeño» hace referencia a una secuencia corta de polinucleótidos que media un proceso de silenciamiento génico postraducción específico de la secuencia, inhibición de traducción, inhibición de transcripción o iARN epigenética en animales (Zamore *et ál.*, 2000, *Cell*, 101, 25-33; Fire *et ál.*,
10 1998, *Nature*, 391, 806; Hamilton *et ál.*, 1999, *Science*, 286, 950-951; Lin *et ál.*, 1999, *Nature*, 402, 128-129; Sharp, 1999, *Genes & Dev.*, 13, 139-141 y Strauss, 1999, *Science*, 286, 886). En determinadas modalidades, un ARNip comprende una primera cadena y una segunda cadena con la misma cantidad de
15 nucleósidos. No obstante, la primera y la segunda cadena se encuentran desfasadas de modo que los dos nucleósidos terminales en la primera y la segunda cadena no se emparejen con un residuo en la cadena complementaria. En determinados casos, los dos nucleósidos no emparejados son residuos de
20 timidina. El ARNip debería incluir una región de suficiente homología con un gen objetivo y tener una longitud suficiente en cuanto a los nucleótidos como para que el ARNip o un fragmento de este pueda mediar la regulación en disminución del gen objetivo. Por lo tanto, un ARNip incluye una región al

menos parcialmente complementaria del ARN objetivo. No es necesario que haya una complementariedad perfecta entre el ARNip y el objetivo, pero la correspondencia debe ser suficiente para permitir que el ARNip o un producto de escisión
5 de este dirijan el silenciamiento específico de secuencia, como mediante escisión de iARN del ARN objetivo. La complementariedad o el grado de homología con la cadena objetivo es más crucial en la cadena antisentido. Si bien a menudo se desea una complementariedad perfecta, en particular
10 en la cadena antisentido, algunas modalidades incluyen uno o más, pero preferentemente 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 o menos errores de emparejamiento con respecto al ARN objetivo. Los errores de emparejamiento se toleran mejor en las regiones terminales y, si se encuentran presentes, se prefieren en una o más regiones
15 terminales, p. ej., dentro de 6, 5, 4 o 3 nucleótidos del extremo 5' y/o 3'. La cadena sentido solo debe ser suficientemente complementaria de la cadena antisentido como para mantener el carácter general de cadena doble de la molécula.

20

Asimismo, un ARNip puede encontrarse modificado o incluir análogos de nucleósidos. Las regiones de cadena simple de un ARNip se pueden modificar o pueden incluir análogos de nucleósidos, p. ej., la región o las regiones no emparejadas de

una estructura horquillada, p. ej., una región que vincule dos regiones complementarias, puede tener modificaciones o análogos de nucleósidos. También es útil la modificación para estabilizar uno o más extremos 3' o 5' de un ARNip, p. ej.,
5 contra exonucleasas, o para favorecer el ingreso del agente de ARNip antisentido en RISC. Las modificaciones pueden incluir enlazadores amino C3 (o C6, C7, C12), enlazadores tiol, enlazadores carboxilo, separadores no nucleotídicos (C3, C6, C9, C12, abásicos, trietilenglicol, hexaetilenglicol),
10 reactivos de fluoresceína o biotina especiales que se presentan como fosforamiditas y que tienen otro grupo hidroxilo protegido con DMT, lo cual permite múltiples acoplamientos durante la síntesis de ARN. Cada cadena de un ARNip puede tener una longitud igual o menor a 30, 25, 24, 23, 22, 21 o 20
15 nucleótidos. La cadena tiene preferentemente una longitud de al menos 19 nucleótidos. Por ejemplo, cada cadena puede tener una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos. Los ARNip preferidos tienen una región doble de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 pares de nucleótidos y uno o más excedentes de 2-3 nucleótidos,
20 preferentemente uno o dos excedentes 3' de 2-3 nucleótidos.

Tal como se utilizan en la presente, los términos «miARN» o «microARN» hacen referencia a ARN pequeños no codificantes de 20-22 nucleótidos, típicamente extraídos de estructuras

precursoras de ARN de pliegue inverso de ~70 nucleótidos conocidas como pre-miARN. Los miARN regulan de forma negativa sus objetivos de una de dos formas, dependiendo del grado de complementariedad entre el miARN y el objetivo. Primero, los

5 miARN que se unen con una complementariedad perfecta o casi perfecta a las secuencias de ARNm que codifican proteína inducen la vía de interferencia mediada por ARN (iARN). Los miARN que ejercen sus efectos reguladores mediante unión con lugares complementarios imperfectos dentro de las regiones sin

10 traducción 3' (UTR, por su sigla en inglés) de sus objetivos de ARNm reprimen la expresión objetivo-gen tras la transcripción, aparentemente a nivel de la traducción, a través de un complejo RISC similar o posiblemente idéntico al que se utiliza para la vía de iARN. De forma coherente con el control de traducción,

15 los miARN que utilizan este mecanismo reducen los niveles de proteína de sus genes objetivo, pero los niveles de ARNm de estos genes solamente se ven afectados de forma mínima. Los miARN comprenden tanto miARN de origen natural como miARN diseñados de forma artificial que pueden dirigirse de forma

20 específica a cualquier secuencia de ARNm. Por ejemplo, en una modalidad, el experto en la técnica puede diseñar construcciones de ARN horquillado corto expresadas como transcripciones primarias de miARN humano (p. ej., miR-30 o miR-21). Este diseño agrega un lugar de procesamiento Drosha a

la construcción horquillada y ha demostrado aumentar en gran medida la eficacia del silenciamiento (Pusch *et ál.*, 2004). El tallo horquillado consiste en 22 nt de ARNcd (p. ej., la antisentido tiene complementariedad perfecta con el objetivo deseado) y un bucle de 15-19 nt de un miR humano. La adición del bucle de miR y las secuencias flanqueantes de miR30 a cada uno o ambos lados de la horquilla produce un aumento de más de 10 veces en el procesamiento de Drosha y Dicer de las horquillas expresadas, en comparación con los diseños de ARNhc convencionales sin microARN. El mayor procesamiento de Drosha y Dicer se traduce en mayor producción de ARNip/miARN y mayor potencia para las horquillas expresadas.

Tal como se utilizan en la presente, los términos «ARNhc» o «ARN horquillado corto» hacen referencia a una estructura de cadena doble que se forma mediante una única cadena de ARN autocomplementaria. Para la inhibición se prefieren las construcciones de ARNhc con una secuencia de nucleótidos idéntica a una parte de la secuencia de codificación o no codificante del gen objetivo. También se ha descubierto que las secuencias de ARN con inserciones, eliminaciones y mutaciones de un solo punto con respecto a la secuencia objetivo son eficaces para la inhibición. Se prefiere una identidad de secuencia mayor al 90 % o incluso una identidad de secuencia

del 100 % entre el ARN inhibidor y la parte del gen objetivo. En determinadas modalidades preferidas, la longitud de la parte de formación de estructuras dobles de un ARNhc es de al menos 20, 21 o 22 nucleótidos de longitud, p. ej., correspondiente en tamaño a productos de ARN producidos mediante escisión dependiente de Dicer. En determinadas modalidades, la construcción de ARNhc tiene una longitud de al menos 25, 50, 100, 200, 300 o 400 bases. En determinadas modalidades, la construcción de ARNhc tiene una longitud de 400-800 bases. Las construcciones de ARNhc tienen una gran tolerancia a la variación en la secuencia de bucle y el tamaño del bucle.

Tal como se utiliza en la presente, el término «ribozima» hace referencia a una molécula de ARN catalíticamente activa que puede escindir de forma específica del lugar un ARNm objetivo. Se han descrito diversos subtipos, p. ej., ribozimas de cabeza de martillo y horquilladas. La estabilidad y la actividad catalítica de las ribozimas pueden mejorar mediante sustitución de ribonucleótidos por desoxirribonucleótidos en bases no catalíticas. Si bien pueden utilizarse ribozinas que escinden el ARNm en secuencias de reconocimiento específicas del lugar para destruir ARNm particulares, se prefiere el uso de ribozimas de cabeza de martillo. Las ribozimas de cabeza de martillo escinden ARNm en ubicaciones indicadas por regiones

flanqueantes que forman pares de bases complementarios con el ARNm objetivo. El único requisito es que el ARNm objetivo tenga las siguientes secuencias de dos bases: 5'-UG-3'. En la técnica se conocen la construcción y producción de ribozimas de cabeza
5 de martillo.

Un método preferido de suministro de un polinucleótido de interés que comprende un ARNip, un miARN, un ARNhc o una ribozima comprende una o más secuencias reguladoras como, por
10 ejemplo, un pol III constitutivo fuerte, p. ej., un promotor de ARNnp U6 humano, el promotor de ARNnp U6 de ratón, el promotor de ARN H1 humano y de ratón y el promotor de ARNt-val humano o un promotor de pol II constitutivo fuerte, como se describe en otro punto en la presente.

15

Los polinucleótidos de la presente invención, independientemente de la longitud de la secuencia de codificación en sí misma, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, como promotores y/o potenciadores, regiones
20 sin traducción (UTR), secuencias de señal, secuencias de Kozak, señales de poliadenilación, lugares enzimáticos de restricción adicionales, lugares de clonación múltiple, lugares de ingreso ribosómico interno (IRES, por su sigla en inglés), lugares de reconocimiento de recombinasa (p. ej., LoxP, FRT y lugares

Att), codones de terminación, señales de terminación de transcripción y polinucleótidos que codifican polipéptidos de autoescisión, etiquetas epitópicas, como se describe en otro punto en la presente o como se conoce en la técnica, de modo
5 que su longitud global puede variar de forma considerable. Por lo tanto, se contempla que se puede utilizar un fragmento de polinucleótido de casi cualquier longitud, con la longitud total preferentemente limitada por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante deseado.

10

Los polinucleótidos se pueden preparar, manipular y/o expresar utilizando cualquiera de diversas técnicas establecidas conocidas y disponibles en la técnica. Para expresar un polipéptido deseado, se puede insertar una secuencia de
15 nucleótidos que codifique el polipéptido en un vector adecuado. Los ejemplos de vectores son plásmidos, secuencias de replicación autónoma y elementos transponibles. Otros ejemplos de vectores incluyen, de modo no taxativo, plásmidos, fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales como cromosoma
20 artificial de levadura (YAC, por su sigla en inglés), cromosoma artificial bacteriano (BAC, por su sigla en inglés) o cromosoma artificial derivado de P1 (PAC, por su sigla en inglés), bacteriófagos como fago lambda o fago M13 y virus animales. Los ejemplos de categorías de virus animales útiles como vectores

incluyen, de modo no taxativo, retrovirus (incluido lentivirus), adenovirus, virus asociado con adeno, herpesvirus (p. ej., virus de herpes simple), poxvirus, baculovirus, papilomavirus y papovavirus (p. ej., SV40). Los ejemplos de
5 vectores de expresión son vectores pClneo (Promega) para expresión en células mamíferas, pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ y pLenti6.2/V5-GW/lacZ (Invitrogen) para transferencia y expresión mediadas por lentivirus en células mamíferas. En modalidades particulares, las secuencias de codificación de las
10 proteínas quiméricas descritas en la presente se pueden ligar en dichos vectores de expresión para expresión de la proteína quimérica en células mamíferas.

En una modalidad, un vector que codifica un CAR contemplado en
15 la presente comprende la secuencia de polinucleótidos que se indica en la SEQ ID NO: 36.

En modalidades particulares, el vector es un vector episomal o un vector que se mantiene de forma extracromosómica. Tal como
20 se utiliza en la presente, el término «episomal» hace referencia a un vector que puede replicarse sin integración en el ADN cromosómico del hospedador y sin pérdida gradual de una célula hospedadora en división, lo cual también significa que dicho vector se replica de forma extracromosómica o episomal.

El vector se modifica genéticamente para contener la secuencia que codifica el origen de replicación del ADN u «ori» de un virus linfotrófico del herpes o un herpesvirus gamma, un adenovirus, SV40, un virus de papiloma bovino o una levadura, especialmente un origen de replicación de un virus linfotrófico del herpes o un herpesvirus gamma correspondiente a oriP de EBV. En un aspecto particular, el virus linfotrófico del herpes puede ser virus de Epstein Barr (EBV), virus del herpes de sarcoma Kaposi (KSHV), virus del herpes saimiri (HS) o virus de enfermedad de Marek (MDV). El virus de Epstein Barr (EBV) y el virus del herpes de sarcoma Kaposi (KSHV) también son ejemplos de un herpesvirus gamma. Típicamente, la célula hospedadora comprende la proteína transactivadora de replicación viral que activa la replicación.

15

Los «elementos de control» o «secuencias reguladoras» presentes en un vector de expresión son las regiones no traducidas del vector-origen de replicación, casetes de selección, promotores, potenciadores, intrones de señales de inicio de traducción (secuencia de Shine Dalgarno o secuencia de Kozak), una secuencia de poliadenilación, regiones sin traducción 5' y 3'- que interactúan con las proteínas celulares hospedadoras para realizar la transcripción y traducción. Estos elementos pueden variar en su fuerza y especificidad. Dependiendo del sistema de

20

vectores y el hospedador utilizados, se puede usar cualquier cantidad de elementos de transcripción y traducción adecuados, incluidos promotores ubicuos y promotores inducibles.

5 En modalidades particulares, un vector para uso en la práctica de la invención que incluye, de modo no taxativo, vectores de expresión y vectores virales, incluirá secuencias de control exógenas, endógenas o heterólogas, como promotores y/o potenciadores. Una secuencia de control «endógena» es una
10 naturalmente enlazada con un gen específico en el genoma. Una secuencia de control «exógena» es una que se coloca en yuxtaposición con un gen mediante manipulación genética (es decir, técnicas de biología molecular), de modo que la transcripción de ese gen se dirija mediante el
15 promotor/potenciador enlazado. Una secuencia de control «heteróloga» es una secuencia exógena de una especie diferente a la célula que se manipula de forma genética.

El término «promotor», tal como se utiliza en la presente, hace
20 referencia a un lugar de reconocimiento de un polinucleótido (ADN o ARN) al que se une una polimerasa del ARN. Una polimerasa del ARN inicia y transcribe polinucleótidos enlazados de forma operativa al promotor. En modalidades particulares, los promotores operativos en células mamíferas

comprenden una región rica en AT ubicada aproximadamente 25 a 30 bases corriente arriba del lugar en el que se inicia la transcripción y/u otra secuencia que se encuentra 70 a 80 bases corriente arriba del inicio de la transcripción, una región
5 CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido.

El término «potenciador» hace referencia a un segmento de ADN que contiene secuencias que pueden brindar una mejor transcripción y, en algunos casos, pueden funcionar de forma
10 independiente de su orientación con respecto a otra secuencia de control. Un potenciador puede funcionar de forma cooperativa o adicional con promotores y/u otros elementos del potenciador. El término «promotor/potenciador» hace referencia a un segmento de ADN que contiene secuencias que pueden brindar tanto
15 funciones promotoras como potenciadoras.

El término «enlazado de forma operativa» hace referencia a una yuxtaposición en la que los componentes descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar de la forma
20 pretendida. En una modalidad, el término hace referencia a un enlace funcional entre una secuencia de control de expresión de ácido nucleico (como un promotor y/o un potenciador) y una segunda secuencia de polinucleótidos, p. ej., un polinucleótido de interés, en el que la secuencia de control de expresión

dirige la transcripción del ácido nucleico que corresponde a la segunda secuencia.

Tal como se utiliza en la presente, el término «secuencia de control de expresión constitutiva» hace referencia a un promotor, potenciador o promotor/potenciador que permite de forma continua o ininterrumpida la transcripción de una secuencia enlazada de forma operativa. Una secuencia de control de expresión constitutiva puede ser un promotor, potenciador o promotor/potenciador «ubícuo» que permita la expresión en diversos tipos de células y tejidos o un promotor, potenciador o promotor/potenciador «específico de la célula», «específico del tipo de célula», «específico del linaje celular» o «específico del tejido» que permita la expresión en una variedad limitada de tipos de células y tejidos, respectivamente.

Las secuencias de control de expresión ubicuas ilustrativas adecuadas para uso en modalidades particulares de la invención incluyen, de modo no taxativo, un promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), un virus simio viral 40 (SV40) (p. ej., temprano o tardío), un promotor LTR de virus de leucemia murina Moloney (MoMLV, por su sigla en inglés), un LTR de virus de sarcoma Rous (RSV), un promotor de virus de herpes simple

(HSV) (timidina cinasa), promotores H5, P7.5 y P11 de virus vaccinia, un promotor del factor de elongación 1-alfa (FE1a, por su sigla en inglés), respuesta temprana al crecimiento 1 (EGR1, por su sigla en inglés), ferritina H (FerH), ferritina L (FerL), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenada (GAPDH, por su sigla en inglés), factor de inicio de traducción eucariota 4A1 (EIF4A1, por su sigla en inglés), proteína de choque calórico de 70 kDa 5 (HSPA5, por su sigla en inglés), proteína de choque término de 90 kDa beta miembro 1 (HSP90B1, por su sigla en inglés), proteína de choque término de 70 kDa (HSP70, por su sigla en inglés), β -cinesina (β -KIN), el locus ROSA 26 humano (Irions *et ál.*, *Nature Biotechnology* 25, 1477 - 1482 (2007)), un promotor de ubiquitina C (UBC), un promotor de fosfoglicerato cinasa-1 (PGK, por su sigla en inglés), un potenciador de citomegalovirus/promotor de β -actina de pollo (CAG), un promotor de β -actina y un potenciador de virus sarcoma mieloproliferativo, promotor sustituido en el lugar de unión al cebador dl587rev (MND) con región de control negativo eliminada (Challita *et ál.*, *J Virol.* 69(2):748-55 (1995)).

20

En una modalidad, un vector de la invención comprende un promotor de MND.

En una modalidad, un vector de la invención comprende un

promotor de EF1a que comprende el primer intrón del gen EF1a humano.

En una modalidad, un vector de la invención comprende un
5 promotor de EF1a que carece del primer intrón del gen EF1a humano.

En una modalidad particular, puede ser deseable la expresión de un polinucleótido que comprenda un CAR de un promotor
10 específico de células T.

Tal como se utiliza en la presente, «expresión condicional» puede hacer referencia a cualquier tipo de expresión condicional que incluye, de modo no taxativo, expresión
15 inducible, expresión reprimible, expresión en células o tejidos con un estado fisiológico, biológico o de enfermedad particular, etc. Esta definición no pretende excluir la expresión específica de un tejido o tipo celular. Determinadas modalidades de la invención brindan expresión condicional de un
20 polinucleótido de interés, p. ej., la expresión se controla sometiendo a una célula, un tejido, un organismo, etc., a un tratamiento o una condición que provoque la expresión del polinucleótido o que genere un aumento o una disminución en la expresión del polinucleótido codificado por el polinucleótido

de interés.

Los ejemplos ilustrativos de promotores/sistemas inducibles incluyen, de modo no taxativo, promotores inducibles por esteroides como promotores para genes que codifican receptores de glucocorticoides o estrógenos (inducibles mediante tratamiento con la hormona correspondiente), promotor de metalotionina (inducible mediante tratamiento con diversos metales pesados), promotor de MX-1 (inducible mediante interferón), el sistema regulable por mifepristona «GeneSwitch» (Sirin et ál., 2003, *Gene*, 323:67), el interruptor génico inducible mediante cumato (WO 2002/088346), sistemas reguladores dependientes de tetraciclina, etc.

La expresión condicional también se puede lograr utilizando una recombinasa de ADN específica del lugar. De acuerdo con determinadas modalidades de la invención, el vector comprende al menos uno (típicamente dos) lugar/es para recombinación mediada por una recombinasa específica del lugar. Tal como se utilizan en la presente, los términos «recombinasa» o «recombinasa específica del lugar» incluyen proteínas, enzimas o factores conjuntos de integración o escisión o proteínas asociadas implicadas en reacciones de recombinación que implican uno o más lugares de recombinación (p. ej., dos, tres,

cuatro, cinco, siete, diez, doce, quince, veinte, treinta, cincuenta, etc.), que pueden ser proteínas de tipo salvaje (remitirse a Landy, Current Opinion in Biotechnology 3:699-707 (1993)) o mutantes, derivados (p. ej., proteínas de fusión con
5 las secuencias de proteínas de recombinación o fragmentos de estas), fragmentos y variantes de estos. Los ejemplos ilustrativos de recombinasas adecuadas para uso en modalidades particulares de la presente invención incluyen, de modo no taxativo: Cre, Int, IHF, Xis, Flp, Fis, Hin, Gin, Φ C31, Cin,
10 Tn3 resolvasa, TndX, XerC, XerD, TnpX, Hjc, Gin, SpCCE1 y ParA.

Los vectores pueden comprender uno o más lugares de recombinación para cualquiera de diversas recombinasas específicas del lugar. Se debe comprender que el lugar objetivo
15 para una recombinasa específica del lugar se suma a cualquier lugar o lugares necesarios para integración a un vector, p. ej., un vector retroviral o vector lentiviral. Tal como se utilizan en la presente, los términos «secuencia de recombinación», «lugar de recombinación» o «lugar de
20 recombinación específico del lugar» hacen referencia a una secuencia de ácido nucleico particular que reconoce y la cual se une una recombinasa.

Por ejemplo, un lugar de recombinación para Cre recombinasa es

loxP, que es una secuencia de 34 pares de bases con dos repeticiones invertidas de 13 pares de bases (que sirven como lugares de unión de recombinasa) que flanquean una secuencia de núcleo de 8 pares de bases (remitirse a la figura 1 de Sauer, B., *Current Opinion in Biotechnology* 5:521-527 (1994)). Otros ejemplos de lugares loxP incluyen, de modo no taxativo: lox511 (Hoess et ál., 1996; Bethke y Sauer, 1997), lox5171 (Lee y Saito, 1998), lox2272 (Lee y Saito, 1998), m2 (Langer et ál., 2002), lox71 (Albert et ál., 1995) y lox66 (Albert et ál., 1995).

Los lugares de reconocimiento adecuados para la recombinasa FLP incluyen, de modo no taxativo: FRT (McLeod, et ál., 1996), F₁, F₂, F₃ (Schlake y Bode, 1994), F₄, F₅ (Schlake y Bode, 1994), FRT(LE) (Senecoff et ál., 1988), FRT(RE) (Senecoff et ál., 1988).

Otros ejemplos de secuencias de reconocimiento son las secuencias attB, attP, attL y attR, que se reconocen mediante la enzima λ Integrasa, p. ej., phi-c31. El SSR ϕ C31 media la recombinación solamente entre los lugares heterotípicos attB (34 pb de longitud) y attP (39 pb de longitud) (Groth et ál., 2000). attB y attP, denominadas según el lugar de unión a la integrasa del fago en los genomas bacterianos y fágicos,

respectivamente, ambas contienen repeticiones invertidas imperfectas probablemente unidas mediante homodímeros ϕ C31 (Groth *et ál.*, 2000). Los lugares del producto, attL y attR, son eficazmente inertes a una mayor recombinación mediada por ϕ C31 (Belteki *et ál.*, 2003), lo cual hace que la reacción sea irreversible. Para inserciones de catalización, se ha descubierto que el ADN con attB se inserta en un lugar attP genómico con mayor facilidad que un lugar de attP en un lugar de attB genómico (Thyagarajan *et ál.*, 2001; Belteki *et ál.*, 2003). Por lo tanto, las estrategias típicas colocan, mediante recombinación homóloga, un «lugar de acoplamiento» con attP en un locus definido, que luego se asocia con una secuencia entrante con attB para inserción.

Tal como se utiliza en la presente, un «lugar de ingreso de ribosoma interno» o «IRES» hace referencia a un elemento que promueve el ingreso directo de ribosoma interno al codón de inicio, como ATG, de un cistron (una región de codificación de proteína), con lo cual se conduce a la traducción del gen independiente del casquete. Remitirse, p. ej., a Jackson *et ál.*, 1990. *Trends Biochem Sci* 15(12):477-83) y Jackson y Kaminski. 1995. *RNA* 1(10):985-1000. En modalidades particulares, los vectores contemplados por la invención incluyen uno o más polinucleótidos de interés que codifican uno

o más polipéptidos. En modalidades particulares, para lograr una traducción eficaz de cada uno de los múltiples polipéptidos, las secuencias de polinucleótidos pueden separarse mediante una o más secuencias IRES o secuencias de
5 polinucleótidos que codifican polipéptidos de autoescisión.

Tal como se utiliza en la presente, el término «secuencia de Kozak» hace referencia a una secuencia de nucleótidos corta que facilita en gran medida la unión inicial de ARNm a la subunidad
10 pequeña del ribosoma y aumenta la traducción. La secuencia de Kozak de consenso es (GCC)RCCATGG, en la que R es una purina (A o G) (Kozak, 1986. *Cell*. 44(2):283-92 y Kozak, 1987. *Nucleic Acids Res.* 15(20):8125-48). En modalidades particulares, los vectores contemplados por la invención comprenden
15 polinucleótidos con una secuencia Kozak de consenso y que codifican un polipéptido deseado, p. ej., un CAR.

En algunas modalidades de la invención, un polinucleótido o una célula que contiene el polinucleótido utiliza un gen suicida,
20 incluido un gen suicida inducible para reducir el riesgo de toxicidad directa y/o proliferación descontrolada. En aspectos específicos, el gen suicida no es inmunogénico del hospedador que contiene el polinucleótido o la célula. Un determinado ejemplo de un gen suicida que se puede utilizar es caspasa-9 o

caspasa-8 o citosina desaminasa. La caspasa-9 puede activarse utilizando un inductor químico específico de dimerización (CID, por su sigla en inglés).

5 En determinadas modalidades, los vectores comprenden segmentos de genes que hacen que las células efectoras inmunes de la invención, p. ej., células T, sean susceptibles a selección negativa in vivo. «Selección negativa» significa que se puede eliminar la célula infundida como resultado de un cambio en la
10 condición in vivo del individuo. El fenotipo seleccionable negativo puede surgir de la inserción de un gen que confiera sensibilidad a un agente administrado, por ejemplo, un compuesto. En la técnica se conocen los genes seleccionables negativos e incluyen, entre otros, los siguientes: el gen de
15 timidina cinasa del virus de herpes simple tipo I (HSV-I TK, por su sigla en inglés) (Wigler et ál., Cell 11:223, 1977) que confiere sensibilidad al ganciclovir, el gen de hipoxantina fosfirribosiltransferasa (HPRT, por su sigla en inglés) celular, el gen de adenina fosforribosiltransferasa (APRT, por
20 su sigla en inglés) celular y la citosina desaminasa bacteriana (Mullen et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 89:33 (1992)).

En algunas modalidades, las células efectoras inmunes genéticamente modificadas, como células T, comprenden un

polinucleótido que comprende además un marcador positivo que permite la selección de células del fenotipo seleccionable negativo *in vitro*. El marcador seleccionable positivo puede ser un gen que, al introducirse en la célula, exprese un fenotipo

5 dominante que permita la selección positiva de células con el gen. En la técnica se conocen los genes de este tipo e incluyen, entre otros, el gen de higromicina-B fosfotransferasa (hph, por su sigla en inglés) que confiere resistencia a la higromicina B, el gen de aminoglucósido fosfotransferasa (neo o

10 aph) de Tn5 que codifica la resistencia al antibiótico G418, el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR), el gen de adenosina desaminasa (ADA) y el gen de resistencia a múltiples fármacos (MDR, por su sigla en inglés).

15 Preferentemente, el marcador seleccionable positivo y el elemento seleccionable negativo se encuentran enlazados de modo que la pérdida del elemento seleccionable negativo también esté necesariamente acompañada por pérdida del marcador seleccionable positivo. De forma incluso más preferible, los

20 marcadores seleccionables positivo y negativo se fusionan para que la pérdida de uno obligatoriamente lleve a pérdida del otro. Un ejemplo de polinucleótidos fusionados que brindan como producto de expresión un polipéptido que confiere tanto las características de selección positivas como negativas deseadas

descritas anteriormente es un gen de fusión de timidina cinasa higromicina fosfotransferasa (HyTK). La expresión de este gen brinda un polipéptido que confiere resistencia a higromicina B para selección positiva in vitro y sensibilidad a ganciclovir para selección negativa in vivo. Remitirse a Lupton S. D., et ál, Mol. and Cell. Biology 11:3374- 3378, 1991. Asimismo, en modalidades preferidas, los polinucleótidos de la invención que codifican los receptores quiméricos se encuentran en vectores retrovirales que contienen el gen fusionado, en particular los que confieren resistencia a higromicina B para selección positiva in vitro y sensibilidad a ganciclovir para selección negativa in vivo, por ejemplo, el vector retroviral de HyTK descrito en Lupton, S. D. et ál. (1991), supra. Remitirse también a las publicaciones de PCT US91/08442 y PCT/US94/05601, de S. D. Lupton, que describen el uso de genes de fusión seleccionables bifuncionales derivados de la fusión de marcadores seleccionables positivos dominantes con marcadores seleccionables negativos.

Los marcadores seleccionables positivos preferidos se derivan de genes seleccionados del grupo que consiste en hph, nco y gpt y los marcadores seleccionables negativos preferidos se derivan de genes seleccionados del grupo que consiste en citosina desaminasa, HSV-I TK, VZV TK, HPRT, APRT y gpt. Los marcadores

especialmente preferidos son genes de fusión seleccionables bifuncionales en los que el marcador seleccionable positivo se deriva de hph o neo y el marcador seleccionable negativo se deriva de citosina desaminasa o un gen TK o marcador
 5 seleccionable. Genes suicidas inducibles

F. VECTORES VIRALES

En modalidades particulares, una célula (p. ej., una célula efectora inmune) se transduce con un vector retroviral, p. ej.,
 10 un vector lentiviral, que codifica un CAR. Por ejemplo, una célula efectora inmune se transduce con un vector que codifica un CAR que comprende un anticuerpo anti-BCMA murino o fragmento de unión al antígeno de este que se une a un polipéptido de BCMA con un dominio de señalización intracelular de CD3ζ, CD28,
 15 4-1BB, Ox40 o cualquier combinación de estos. Por lo tanto, estas células transducidas pueden provocar una respuesta citotóxica mediada por CAR.

Los retrovirus son una herramienta común para suministro génico
 20 (Miller, 2000, *Nature*. 357: 455:-460). En modalidades particulares, se utiliza un retrovirus para suministrarle un polinucleótido que codifique un receptor de antígeno quimérico (CAR) a una célula. Tal como se utiliza en la presente, el término «retrovirus» hace referencia a un virus de ARN que

- transcribe de forma inversa su ARN genómico en una copia de ADN de cadena doble lineal y, posteriormente, integra de forma covalente su ADN genómico en un genoma hospedador. Una vez que el virus se integra en el genoma hospedador, este se denomina
- 5 «provirus». El provirus sirve como plantilla para la polimerasa de ARN II y dirige la expresión de moléculas de ARN que codifican proteínas y enzimas estructurales necesarias para producir nuevas partículas virales.
- 10 Los retrovirus ilustrativos adecuados para uso en modalidades particulares incluyen, de modo no taxativo: virus de leucemia murina de Moloney (M-MuLV, por su sigla en inglés), virus de sarcoma murino de Moloney (MoMSV), virus de sarcoma murino de Harvey (HaMuSV, por su sigla en inglés), virus de tumor
- 15 mamífero murino (MuMTV, por su sigla en inglés), virus de leucemia de primates gibones (GaLV, por su sigla en inglés), virus de leucemia felina (FLV, por su sigla en inglés), spumavirus, virus de leucemia murina de Friend, virus de células madres murinas (MSCV, por su sigla en inglés) y virus
- 20 de sarcoma Rous (RSV)) y lentivirus.

Tal como se utiliza en la presente, el término «lentivirus» hace referencia a un grupo (o género retrovirus complejos. Los lentivirus ilustrativos incluyen, de modo no taxativo: HIV

(virus de inmunodeficiencia humana, incluido HIV tipo 1 y HIV tipo 2), virus de visna-maedi (VMV), virus de artritis-encefalitis caprina (CAEV), virus de anemia infecciosa equina (EIAV), virus de inmunodeficiencia felina (FIB), virus de
5 inmunodeficiencia bovina (BIV) y virus de inmunodeficiencia simia (SIV). En una modalidad, se prefieren las estructuras principales del vector basado en VIH (es decir, elementos de secuencia de actuación en cis de HIV). En modalidades particulares, se utiliza un lentivirus para suministrarle un
10 polinucleótido con un CAR a una célula.

Los vectores retrovirales y, de forma más particular, vectores lentivirales, se pueden utilizar en la realización de modalidades particulares de la presente invención. Por
15 consiguiente, el término «retrovirus» o «vector retroviral», tal como se utiliza en la presente, pretende incluir «lentivirus» y «vectores lentivirales» respectivamente.

El término «vector» se utiliza en la presente para hacer
20 referencia a una molécula de ácido nucleico que puede transferir o transportar otra molécula de ácido nucleico. El ácido nucleico transferido generalmente se enlaza, p. ej., se inserta, en la molécula de ácido nucleico del vector. Un vector puede incluir secuencias que dirijan la replicación autónoma en

una célula o puede incluir secuencias suficientes para permitir la integración en el ADN de la célula hospedadora. Los vectores útiles incluyen, por ejemplo, plásmidos (p. ej., plásmidos de ADN o plásmidos de ARN), transposones, cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos y vectores virales. Los vectores virales útiles incluyen, p. ej., retrovirus y lentivirus defectivos de replicación.

Como será evidente para el experto en la técnica, el término «vector viral» se utiliza ampliamente para hacer referencia a una molécula de ácido nucleico (p. ej., un plásmido de transferencia) que incluye elementos de ácido nucleico derivados de virus que típicamente facilitan la transferencia de la molécula de ácido nucleico o su integración en el genoma de una célula o en una partícula viral que medie la transferencia de ácido nucleico. Las partículas virales típicamente incluirán diversos componentes virales y, en algunas oportunidades, también componentes de células hospedadores además de uno o más ácidos nucleicos.

20

El término vector viral puede hacer referencia a un virus o una partícula viral que pueda transferir un ácido nucleico a una célula o al ácido nucleico transferido en sí mismo. Los vectores virales y plásmidos de transferencia contienen

elementos genéticos funcionales y/o estructurales que se derivan principalmente de un virus. El término «vector retroviral» hace referencia a un vector viral o plásmido con elementos funcionales y estructurales, o partes de estos, que se derivan principalmente de un retrovirus. El término «vector lentiviral» hace referencia a un vector viral o plásmido con elementos funcionales y estructurales, o partes de estos, incluidos LTR, que se derivan principalmente de un lentivirus. El término «vector híbrido» hace referencia a un vector, LTR u otro ácido nucleico que contenga tanto secuencias retrovirales, p. ej., lentivirales, como secuencias virales no lentivirales. En una modalidad, un vector híbrido hace referencia a un vector o plásmido de transferencia que comprende secuencias retrovirales, p. ej., lentivirales, para transcripción inversa, replicación, integración y/o envoltura.

En modalidades particulares, los términos «vector lentiviral», «vector de expresión lentiviral» pueden utilizarse para hacer referencia a plásmidos de transferencia lentivirales y/o partículas lentivirales infecciosas. Cuando se hace referencia en la presente a elementos como lugares de clonación, promotores, elementos reguladores, ácidos nucleicos heterólogos, etc., se comprende que las secuencias de estos elementos se encuentran presentes en forma de ARN en las

partículas lentivirales de la invención y se encuentran presentes en forma de ADN en los plásmidos de ADN de la invención.

5 En cada extremo del provirus hay estructuras denominadas «repeticiones terminales largas» o «LTR». El término «repetición terminal larga (LTR, por su sigla en inglés)» hace referencia a dominios de pares de bases ubicados en los extremos de ADN retrovirales que, en su contexto de secuencia
10 natural, son repeticiones directas y contienen regiones U3, R y U5. Las LTR generalmente brindan funciones fundamentales para la expresión de genes retrovirales (p. ej., promoción, inicio y poliadenilación de transcripciones génicas) y para la replicación viral. La LTR contiene diversas señales reguladoras
15 que incluyen elementos de control de transcripción, señales de poliadenilación y secuencias necesarias para replicación e integración del genoma viral. La LTR viral se divide en tres regiones denominadas U3, R y U5. La región U3 contiene los elementos promotores y potenciadores. La región U5 es la
20 secuencia entre el lugar de unión al cebador y la región R y contiene la secuencia de poliadenilación. La región R (repetición) está flanqueada por las regiones U3 y U5. La LTR está compuesta por regiones U3, R y U5 y aparece en los extremos 5' y 3' del genoma viral. Adyacentes a la LTR 5' se

encuentran secuencias necesarias para transcripción inversa del genoma (el lugar de unión a cebador de ARNt) y envoltura eficaz de ARN viral en partículas (el lugar Psi).

5 Tal como se utiliza en la presente, el término «señal de envoltura» o «secuencia de envoltura» hace referencia a secuencias ubicadas dentro del genoma retroviral necesarias para inserción del ARN viral en la partícula o cápside viral, remitirse, p. ej., a Clever *et ál.*, 1995. *J. of Virology*, tomo
10 69, No. 4; pp. 2101-2109. Diversos vectores retrovirales utilizan la señal de envoltura mínima (también indicada como la secuencia psi [Ψ]) necesaria para encapsidación del genoma viral. Por lo tanto, tal como se utilizan en la presente, los términos «secuencia de envoltura», «señal de envoltura», «psi»
15 y el símbolo « Ψ » se utilizan en referencia a la secuencia no codificante necesaria para encapsidación de las cadenas de ARN retroviral durante la formación de la partícula viral.

En diversas modalidades, los vectores comprenden LTR 5' y/o LT
20 3' modificadas. Una cualquiera o ambas LTR pueden comprender una o más modificaciones que incluyen, de modo no taxativo, una o más eliminaciones, inserciones o sustituciones. Las modificaciones de la LTR 3' se realizan a menudo para mejorar la seguridad de sistemas lentivirales o retrovirales haciendo

que los virus sean defectuosos para la replicación. Tal como se utiliza en la presente, el término «defectuoso para la replicación» hace referencia a un virus que no puede completar una replicación eficaz, de modo que no se producen viriones infecciosos (p. ej., progenie lentiviral defectuosa para replicación). El término «competente para replicación» hace referencia a virus de tipo salvaje o virus mutante con capacidad de replicación, de modo que la replicación viral del virus permita la producción de viriones infecciosos (p. ej., progenie lentiviral competente para replicación).

Vectores «de autoinactivación» (SIN, por su sigla en inglés) hace referencia a vectores defectuosos para replicación, p. ej., vectores retrovirales o lentivirales, en los que la región promotora-potenciadora de la LTR derecha (3'), conocida como la región U3, se encuentra modificada (p. ej., mediante eliminación o sustitución) para evitar la transcripción viral más allá de la primera ronda de replicación viral. Esto se debe a que la región U3 de la LTR derecha (3') se utiliza como plantilla para la región U3 de la LTR izquierda (5') durante la replicación viral y, por lo tanto, la transcripción viral no se puede realizar sin el promotor-potenciador U3. En una modalidad adicional de la invención, la LTR 3' se modifica de modo que la región U5 se remplace, por ejemplo, con una secuencia de

poli(A) ideal. Cabe señalar que en la invención también se incluyen modificaciones en las LTR, como modificaciones de la LTR 3', la LTR 5' o las LTR 3' y 5'.

5 Se brinda un potenciamiento adicional de la seguridad mediante
reemplazo de la región U3 de la LTR 5' con un promotor
heterólogo para impulsar la transcripción del genoma viral
durante la producción de partículas virales. Los ejemplos de
promotores heterólogos que se pueden utilizar incluyen, por
10 ejemplo, promotores de virus simio viral 40 (SV40) (p. ej.,
temprano o tardío), citomegalovirus (CMV) (p. ej., temprano
inmediato), virus de leucemia murina de Moloney (MoMLV), virus
de sarcoma de Rous (RSV) y virus de herpes simple (HSV)
(timidina cinasa). Los promotores típicos pueden impulsar
15 niveles elevados de transcripción de forma independiente de
Tat. Este reemplazo reduce la posibilidad de la recombinación de
generar un virus competente para replicación, debido a que no
hay una secuencia U3 completa en el sistema de producción del
virus. En determinadas modalidades, el promotor heterólogo
20 tiene ventajas adicionales en el control de la forma en la que
se transcribe el genoma viral. Por ejemplo, el promotor
heterólogo puede ser inducible, de modo que la transcripción de
todo o parte del genoma viral se produzca solamente cuando se
encuentren presentes los factores de inducción. Los factores de

inducción incluyen, de modo no taxativo, uno o más compuestos químicos o las condiciones fisiológicas como la temperatura o el pH, en los cuales se cultivan las células hospedadoras.

5 En algunas modalidades, los vectores virales comprenden un elemento TAR. El término «TAR» hace referencia al elemento genético «de respuesta trans-activación» ubicado en la región R de LTR lentivirales (p. ej., HIV). Este elemento interactúa con el elemento genético trans-activador (tat) lentiviral para
10 potenciar la replicación viral. No obstante, este elemento no es necesario en las modalidades en las que la región U3 de la LTR 5' se reemplaza con un promotor heterólogo.

La «región R» hace referencia a la región dentro de las LTR
15 retrovirales que comienza al inicio del grupo de casquete (es decir, el inicio de la transcripción) y que finaliza inmediatamente antes del inicio de la extensión de poli A. La región R también se define como flanqueada por las regiones U3 y U5. La región R tiene incidencia durante la transcripción
20 inversa al permitir la transferencia de ADN naciente de un extremo del genoma al otro.

Tal como se utiliza en la presente, el término «elemento FLAP» hace referencia a un ácido nucleico cuya secuencia incluye la

extensión de polipurina central y las secuencias de terminación central (cPPT y CTS) de un retrovirus, p. ej., HIV-1 o HIV-2. Los elementos FLAP adecuados se describen en la patente estadounidense n.º 6,682,907 y en Zennou, *et ál.*, 2000, *Cell*, 5 101:173. Durante la transcripción inversa de HIV-1, el inicio central del ADN de cadena más en la extensión de polipurina central (cPPT) y la terminación central en la secuencia de terminación central (CTS, por su sigla en inglés) llevan a la formación de una estructura de ADN de cadena triple: el flap de 10 ADN central de HIV-1. Si bien no se desea limitarse a ninguna teoría, el flap de ADN puede actuar como un determinante activo en cis de la importación nuclear de genoma lentiviral y/o puede aumentar la titulación del virus. En modalidades particulares, las estructuras principales del vector retroviral o lentiviral 15 comprenden uno o más elementos FLAP corriente arriba o corriente abajo de los genes heterólogos de interés en los vectores. Por ejemplo, en modalidades particulares, un plásmido de transferencia incluye un elemento FLAP. En una modalidad, un vector de la invención comprende un elemento FLAP aislado de 20 HIV-1.

En una modalidad, los vectores de transferencia retroviral o lentiviral comprenden uno o más elementos de exportación. El término «elemento de exportación» hace referencia a un elemento

regulador postranscripción de actuación en cis que regula el transporte de una transcripción de ARN del núcleo al citoplasma de una célula. Los ejemplos de elementos de exportación de ARN incluyen, de modo no taxativo, el elemento de respuesta rev
5 (RRE, por su sigla en inglés) del virus de inmunodeficiencia humano (HIV) (remitirse, p. ej., a Cullen *et ál.*, 1991. *J. Virol.* 65: 1053 y Cullen *et ál.*, 1991. *Cell* 58: 423) y el elemento regulador postranscripción del virus B de hepatitis (HPRE, por su sigla en inglés). En general, el elemento de
10 exportación de ARN se coloca dentro de la UTR 3' de un gen y puede insertarse como una o múltiples copias.

En modalidades particulares, la expresión de secuencias heterólogas en vectores virales aumenta mediante incorporación
15 de elementos reguladores postranscripción, lugares de poliadenilación eficaces y, opcionalmente, señales de terminación de transcripción en los vectores. Diversos elementos reguladores postranscripción pueden aumentar la expresión de un ácido nucleico heterólogo en la proteína, p.
20 ej., el elemento regulador postranscripción del virus de hepatitis de la marmota (WPRE, Zufferey *et ál.*, 1999, *J. Virol.*, 73:2886), el elemento regulador postranscripción presente en el virus de hepatitis B (HPRE) (Huang *et ál.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:3864) y similares (Liu *et ál.*, 1995, *Genes Dev.*,

9:1766). En modalidades particulares, los vectores de la invención comprenden un elemento regulador postranscripción como un WPRE o HPRE.

5 En modalidades particulares, los vectores de la invención carecen de o no comprenden un elemento regulador postranscripción (PTE) como WPRE o HPRE dado que, en algunos casos, estos elementos aumentan el riesgo de transformación celular y/o no aumentan de forma sustancial o significativa la
10 cantidad de transcripción de ARNm o aumentan la estabilidad del ARNm. Por lo tanto, en algunas modalidades, los vectores de la invención carecen de o no comprenden un PTE. En otras modalidades, los vectores de la invención carecen de o no comprenden un WPRE o HPRE como medida de seguridad adicional.

15

Los elementos que dirigen la terminación y poliadenilación eficaces de las transcripciones de ácido nucleico heterólogo aumentan la expresión génica heteróloga. Las señales de terminación de transcripción se encuentran generalmente
20 corriente abajo de la señal de poliadenilación. En modalidades particulares, los vectores comprenden una secuencia de poliadenilación 3' de un polinucleótido que codifica un polipéptido que se debe expresar. El término «lugar de poli A» o «secuencia de poli A», tal como se usa en la presente, indica

una secuencia de ADN que dirige tanto la terminación como la poliadenilación de la transcripción del ARN naciente mediante ARN polimerasa II. Las secuencias de poliadenilación pueden promover la estabilidad del ARNm mediante adición de una cola de poliA en el extremo 3' de la secuencia de codificación y, por lo tanto, contribuir a una mayor eficacia de traducción. La poliadenilación eficaz de la transcripción recombinante es deseable, dado que las transcripciones que carecen de una cola de poli A son inestables y se degradan con rapidez. Los ejemplos ilustrativos de señales de poliA que se pueden utilizar en un vector de la invención incluyen una secuencia de poliA ideal (p. ej., AATAAA, ATTAAA, AGTAAA), una secuencia de poliA de la hormona de crecimiento bovina (BGHpA, por su sigla en inglés), una secuencia de poliA de β -globina de conejo (r β gpA, por su sigla en inglés) u otra secuencia de poliA endógena o heteróloga adecuada conocida en la técnica.

En determinadas modalidades, un vector retroviral o lentiviral comprende además uno o más elementos aislantes. Los elementos aislantes pueden contribuir con la protección de secuencias de expresión de lentivirus, p. ej., polipéptido terapéuticos, de efectos en lugares de integración que se pueden mediar con elementos de actuación en cis presentes en el ADN genómico y que llevan a una expresión desregulada de secuencias de

transferencia (es decir, efecto de colocación, remitirse, p. ej., a Burgess-Beusse *et ál.*, 2002, *Proc. Natl. Acad. Sci., EUA*, 99:16433 y Zhan *et ál.*, 2001, *Hum. Genet.*, 109:471). En algunas modalidades, los vectores de transferencia comprenden uno o más elementos aislantes de la LTR 3' y, tras la integración del provirus en el genoma hospedador, el provirus comprende el o los aislantes en la LTR 5' o LTR3' mediante duplicación de la LTR 3'. Los aislantes adecuados para uso en la invención incluyen, de modo no taxativo, el aislante de β -globina de pollo (remitirse a Chung *et ál.*, 1993. *Cell* 74:505; Chung *et ál.*, 1997. *PNAS* 94:575 y Bell *et ál.*, 1999. *Cell* 98:387, que se incorporan a la presente mediante esta referencia). Los ejemplos de elementos aislantes incluyen, de modo no taxativo, un aislante de un locus de β -globina, como HS4 de pollo.

De acuerdo con determinadas modalidades específicas de la invención, la mayoría o todas las secuencias de estructura principal del vector viral se derivan de un lentivirus, p. ej., HIV-1. No obstante, se debe comprender que se pueden utilizar o combinar muchas fuentes diferentes de secuencias retrovirales y/o lentivirales o sustituciones y alteraciones diversas y en algunas de las secuencias lentivirales se pueden adaptar sin alterar la capacidad de un vector de transferencia de realizar

las funciones descritas en la presente. Asimismo, en la técnica se conocen diversos vectores lentivirales, remitirse a Naldini *et ál.*, (1996a, 1996b y 1998); Zufferey *et ál.*, (1997); Dull *et ál.*, 1998, patentes estadounidenses n.º 6,013,516 y 5,994,136, muchos de los cuales se pueden adaptar para producir un vector viral o plásmido de transferencia de la presente invención.

En diversas modalidades, los vectores de la invención comprenden un promotor enlazado de forma operativa a un polinucleótido que codifica un polipéptido de CAR. Los vectores pueden tener una o más LTR, en las que cualquiera de las LTR comprende una o más modificaciones, como una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos. Los vectores también pueden comprender uno o más elementos accesorios para aumentar la eficacia de la transducción (p. ej., un cPPT/FLAP), la envoltura viral (p. ej., una señal de envoltura Psi (Ψ), RRE) y/u otros elementos que aumenten la expresión génica terapéutica (p. ej., secuencias de poli (A)) y pueden comprender opcionalmente un WPRE o HPRE.

20

En una modalidad particular, el vector de transferencia de la invención comprende una LTR retroviral izquierda (5'), una extensión de polipurina central/flap de ADN (cPPT/FLAP), un elemento de exportación retroviral, un promotor activo en una

célula T enlazado de forma operativa a un polinucleótido que codifique un polipéptido de CAR contemplado en la presente y una LTR retroviral derecha (3') y, opcionalmente, un WPRE o HPRE.

5

En una modalidad particular, el vector de transferencia de la invención comprende una LTR retroviral izquierda (5'), un elemento de exportación retroviral, un promotor activo en una célula T enlazado de forma operativa a un polinucleótido que codifique un polipéptido de CAR contemplado en la presente, una LTR retroviral derecha (3') y una secuencia de poli (A) y, opcionalmente, un WPRE o HPRE. En otra modalidad particular, la invención brinda un vector lentiviral que comprende: una LTR izquierda (5'), una cPPT/FLAP, un RRE, un promotor activo en una célula T enlazado de forma operativa a un polinucleótido que codifique un polipéptido de CAR contemplado en la presente, una LTR derecha (3') y una secuencia de poliadenilación y, opcionalmente, un WPRE o HPRE.

20 En una modalidad determinada, la invención brinda un vector lentiviral que comprende: una LTR de HIV-1 izquierda (5'), una señal de envoltura Psi (Ψ), una cPPT/FLAp, un RRE, un promotor activo en una célula T enlazado de forma operativa a un polinucleótido que codifique un polipéptido de CAR contemplado

en la presente, una LTR de HIV-1 de autoinactivación (SIN) derecha (3') y una secuencia de poliadenilación de β -globina de conejo y, opcionalmente, un WPRE o HPRE.

5 En otra modalidad, la invención brinda un vector que comprende: al menos una LTR, una extensión de polipurina central/flap de ADN (cPPT/FLAP), un elemento de exportación retroviral y un promotor activo en una célula T enlazado de forma operativa a un polinucleótido que codifique un polipéptido de CAR
10 contemplado en la presente y, opcionalmente, un WPRE o HPRE.

En una modalidad particular, la invención brinda un vector que comprende al menos una LTR, una cPPT/FLAP, un RRE, un promotor activo en una célula T enlazado de forma operativa a un
15 polinucleótido que codifique un polipéptido de CAR contemplado en la presente y una secuencia de poliadenilación y, opcionalmente, un WPRE o HPRE.

En una modalidad determinada, la presente invención brinda al
20 menos una LTR de HIV-1 SIN, una señal de envoltura Psi (Ψ), una cPPT/FLAp, un RRE, un promotor activo en una célula T enlazado de forma operativa a un polinucleótido que codifique un polipéptido de CAR contemplado en la presente y una secuencia de poliadenilación de β -globina de conejo y, opcionalmente, un

WPRE o HPRE.

En diversas modalidades, el vector es un vector viral de integración.

5

En otras diversas modalidades, el vector es un vector viral episomal o sin integración.

En diversas modalidades, los vectores contemplados en la
10 presente comprenden retrovirus de integración o sin integración defectuosos. En una modalidad, un retrovirus o lentivirus «de integración defectuoso» hace referencia a retrovirus o lentivirus con una integrasa que carece de la capacidad de integrar el genoma viral en el genoma de las células
15 hospedadoras. En diversas modalidades, la proteína integrasa se muta para disminuir específicamente su actividad de integrasa. Los vectores lentivirales incompetentes para la integración se obtienen modificando el gen pol que codifica la proteína integrasa, lo cual produce un gen pol mutado que codifica una
20 integrasa de integración deficiente. Estos vectores virales incompetentes para la integración se han descrito en la solicitud de patente WO 2006/010834, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

Las mutaciones ilustrativas en el gen pol de HIV-1 adecuadas para reducir la actividad de integrasa incluyen, de: H12N, H12C, H16C, H16V, S81 R, D41A, K42A, H51A, Q53C, D55V, D64E, D64V, E69A, K71A, E85A, E87A, D116N, D116I, D116A, N120G, N120I, N120E, E152G, E152A, D35E, K156E, K156A, E157A, K159E, K159A, K160A, R166A, D167A, E170A, H171A, K173A, K186Q, K186T, K188T, E198A, R199C, R199T, R199A, D202A, K211A, Q214L, Q216L, Q221 L, W235F, W235E, K236S, K236A, K246A, G247W, D253A, R262A, R263A y K264H.

10

Las mutaciones ilustrativas en el gen pol de HIV-1 adecuadas para reducir la actividad de integrasa incluyen, de: D64E, D64V, E92K, D116N, D116I, D116A, N120G, N120I, N120E, E152G, E152A, D35E, K156E, K156A, E157A, K159E, K159A, W235F y W235E.

15

En una modalidad particular, una integrasa comprende una mutación en uno o más de los aminoácidos D64, D116 o E152. En una modalidad, una integrasa comprende una mutación los aminoácidos D64, D116 y E152. En una modalidad particular, una integrasa de HIV-1 defectuosa comprende una mutación D64V.

20

Una «célula hospedadora» incluye células electroporadas, transfectadas, infectadas o transducidas *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* con un vector recombinante o un polinucleótido de la

invención. Las células hospedadoras pueden incluir células de envoltura, células productoras y células infectadas con vectores virales. En modalidades particulares, las células hospedadoras infectadas con el vector viral de la invención se
5 administran a un sujeto que necesita terapia. En determinadas modalidades, el término «célula objetivo» se utiliza de forma intercambiable con célula hospedadora y hace referencia a células transfectadas, infectadas o transducidas de un tipo celular deseado. En modalidades preferidas, la célula objetivo
10 es una célula T.

A menudo se necesita producción de partículas virales a gran escala para lograr una titulación viral razonable. Las partículas virales se producen transfectando un vector de
15 transferencia en una línea celular de envoltura que comprenda genes accesorios y/o estructurales virales, p. ej., genes gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpu, vpx o nef u otros genes retroviral.

20 Tal como se utiliza en la presente, el término «vector de envoltura» hace referencia a un vector de expresión o vector viral que carece de una señal de envoltura y comprende un polinucleótido que codifica uno, dos, tres, cuatro o más genes accesorios y/o estructurales virales. Típicamente, los vectores

de envoltura se incluyen en una célula de envoltura y se introducen en la célula mediante transfección, transducción o infección. Los expertos en la técnica conocen métodos de transfección, transducción o infección. Un vector de transferencia retroviral/lentiviral de la presente invención puede introducirse en una línea celular de envoltura mediante transfección, transducción o infección para generar una línea celular o célula productora. Los vectores de envoltura de la presente invención se pueden introducir en líneas celulares o células humanas a través de métodos estándares que incluyen, p. ej., transfección con fosfato cálcico, lipofección o electroporación. En algunas modalidades, los vectores de envoltura se introducen en las células junto con un marcador seleccionable dominante, como neomicina, higromicina, puromicina, blastocidina, zeocina, timidina cinasa, DHFR, Gln sintetasa o ADA, seguido por selección con el fármaco adecuado y aislamiento de clones. Un gen marcador seleccionable se puede enlazar físicamente con genes codificados por el vector de envoltura, p. ej., mediante IRES o péptidos virales de autoescisión.

Las proteínas de envoltura viral (env) determinan el espectro de células hospedadoras que pueden infectarse y transformarse en última instancia mediante retrovirus recombinantes generados

a partir de las líneas celulares. En el caso de lentivirus, como HIV-1, HIV-2, SIV, FIV y EIV, las proteínas env incluyen gp41 y gp120. Preferentemente, las proteínas env virales expresadas mediante células de envoltura de la invención se
5 codifican en un vector separado mediante los genes gag y pol virales, como se describió previamente.

Los ejemplos ilustrativos de genes env de derivación retroviral que se pueden utilizar en la invención incluyen, de modo no
10 taxativo: envolturas MLV, envoltura 10A1, BAEV, FeLV-B, RD114, SSAV, Ébola, Sendai, FPV (virus de plaga aviaria) y envolturas de virus de influenza. De forma similar, se pueden utilizar envolturas de codificación génica de virus del ARN (p. ej., familias de virus del ARN de Picornaviridae, Calciviridae,
15 Astroviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Reoviridae, Birnaviridae, Retroviridae), así como de virus del ADN (familias de Hepadnaviridae, Circoviridae, Parvoviridae, Papovaviridae,
20 Adenoviridae, Herpesviridae, Poxviridae e Iridoviridae). Los ejemplos representativos incluyen FeLV, VEE, HFVW, WDSV, SFV, Rabies, ALV, BIV, BLV, EBV, CAEV, SNV, ChTLV, STLV, MPMV, SMRV, RAV, FuSV, MH2, AEV, AMV, CT10 y EIAV.

En otras modalidades, las proteínas de envoltura para pseudotipar un virus de la presente invención incluyen, de modo no taxativo, cualquiera de los siguientes virus: influenza A, como H1N1, H1N2, H3N2 y H5N1 (gripe aviar), influenza B, virus de influenza C, virus de hepatitis A, virus de hepatitis B, virus de hepatitis C, virus de hepatitis D, virus de hepatitis E, rotavirus, cualquier virus del grupo de virus Norwalk, adenovirus entéricos, parvovirus, virus de fiebre del Dengue, viruela de los monos, mononegavirales, Lyssavirus como virus de la rabia, virus del murciélago de Lagos, virus de Mokola, virus de Duvenhage, virus del murciélago europeo 1 y 2 y virus del murciélago australiano, efemorovirus, vesiculovirus, virus de estomatitis vesicular (VSV), herpesvirus como virus del herpes simple tipos 1 y 2, varicela zoster, citomegalovirus, virus de Epstein-Bar (EBV), herpesvirus humanos (HHV), herpesvirus humanos tipo 6 y 8, virus de inmunodeficiencia humana (HIV), virus de papiloma, gamaherpesvirus murino, arenavirus como virus de fiebre hemorrágica argentina, virus de fiebre hemorrágica boliviana, virus de fiebre hemorrágica asociada con Sabia, virus de fiebre hemorrágica venezolana, virus de fiebre de Lassa, virus de Machupo, virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV, por su sigla en inglés), Bunyaviridae como virus de fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, Hantavirus, fiebre hemorrágica con virus que provoca síndrome renal, virus de

fiebre del valle del Rift, Filoviridae (filovirus), incluida fiebre hemorrágica del Ébola y fiebre hemorrágica de Marburgo, Flaviviridae incluido virus de la enfermedad de la selva de Kaysanur, virus de fiebre hemorrágica de Omsk, virus que
5 provoca encefalitis transmitido por garrapatas y Paramyxoviridae como virus de Hendra y virus de Nipah, viruela mayor y viruela menor (viruela), alfavirus como virus de encefalitis equina de Venezuela, virus de encefalitis equina oriental, virus de encefalitis equina occidental, coronavirus
10 asociado con SARS (SARS-CoV), por su sigla en inglés), virus del Nilo occidental, cualquier virus que provoque encefalitis.

En una modalidad, la invención brinda células de envoltura que producen retrovirus recombinantes, p. ej., lentivirus,
15 pseudotipados con la glicoproteína VSV-G.

Los términos «pseudotipo» y «pseudotipado», tal como se utilizan en la presente, hacen referencia a un virus cuyas proteínas de envoltura se sustituyeron con las de otro virus
20 que poseía características preferibles. Por ejemplo, el HIV se puede pseudotipar con proteínas de envoltura de la proteína G del virus de estomatitis vesicular (VSV-G, por su sigla en inglés), lo cual le permite al HIV infectar un mayor espectro de células, dado que las proteínas de envoltura del HIV

(codificado por el gen env) normalmente dirigen el virus a células que presentan CD4+. En una modalidad preferida de la invención, las proteínas de envoltura lentivirales se pseudotipan con VSV-G. En una modalidad, la invención brinda
5 células de envoltura que producen retrovirus recombinantes, p. ej., lentivirus, pseudotipadas con la glicoproteína de envoltura VSV-G.

Tal como se utiliza en la presente, el término «líneas
10 celulares de envoltura» se utiliza en referencia a líneas celulares que no contienen una señal de envoltura, pero que expresan de forma estable o transitoria proteínas estructurales virales y enzimas de replicación (p. ej., gag, pol y env) necesarias para la envoltura correcta de partículas virales. Se
15 puede utilizar cualquier línea celular adecuada para preparar células de envoltura de la invención. En general, las células son células de mamífero. En una modalidad particular, las células que se utilizan para producir la línea celular de envoltura son células humanas. Las líneas celulares adecuadas
20 que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, células CHO, células BHK, células MDCK, células C3H 10T1/2, células FLY, células Psi-2, células BOSC 23, células PA317, células WEHI, células COS, células BSC 1, células BSC 40, células BMT 10, células VERO, células W138, células MRC5, células A549, células

HT1080, células 293, células 293T, células B-50, células 3T3, células NIH3T3, células HepG2, células Saos-2, células Huh7, células HeLa, células W163, células 211 y células 211A. En modalidades preferidas, las células de envoltura son células
5 293, células 293T o células A549. En otra modalidad preferida, las células son células A549.

Tal como se utiliza en la presente, el término «línea celular productora» hace referencia a una línea celular que puede
10 producir partículas retrovirales recombinantes, que comprende una línea celular de envoltura y una construcción de vector de transferencia que comprende una señal de envoltura. La producción de partículas virales infecciosas y soluciones madre virales puede realizarse utilizando técnicas convencionales. En
15 la técnica se conocen métodos para preparar soluciones madre virales y estos se ilustran, p. ej., en Y. Soneoka *et ál.* (1995) *Nucl. Acids Res.* 23:628-633 y N. R. Landau *et ál.* (1992) *J. Virol.* 66:5110-5113. Las partículas de virus infecciosas se pueden recoger de las células de envoltura utilizando técnicas
20 convencionales. Por ejemplo, las partículas infecciosas se pueden recoger mediante lisis celular o recolección del sobrenadante del cultivo celular, como se conoce en la técnica. Opcionalmente, las partículas de virus recolectadas se pueden purificar si se desea. Los expertos en la técnica conocen las

técnicas de purificación adecuadas.

El suministro de uno o más genes u otras secuencias de polinucleótidos con un vector retroviral o lentiviral mediante
5 infección viral en lugar de transfección se indica como una «transducción». En una modalidad, los vectores retrovirales se transducen en una célula mediante infección e integración del provirus. En determinadas modalidades, una célula objetivo, p. ej., una célula T, se «transduce» si esta comprende un gen u
10 otra secuencia de polinucleótidos que se suministra a la célula mediante infección utilizando un vector viral o retroviral. En modalidades particulares, una célula transducida comprende uno o más genes u otras secuencias de polinucleótidos que se suministran mediante un vector retroviral o lentiviral en su
15 genoma celular.

En modalidades particulares, las células hospedadoras transducidas con el vector viral de la invención que expresa uno o más polipéptidos se administran a un sujeto para tratar
20 y/o prevenir una neoplasia de células B. Otros métodos relacionados con el uso de vectores virales en terapia génica, que se pueden utilizar de acuerdo con determinadas modalidades de la presente invención, se pueden encontrar, p. ej., en Kay, M. A. (1997) *Chest* 111(6 Supp.):138S-142S; Ferry, N. y Heard,

J. M. (1998) *Hum. Gene Ther.* 9:1975-81; Shiratory, Y. et ál. (1999) *Liver* 19:265-74; Oka, K. et ál. (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11:179-86; Thule, P. M. y Liu, J. M. (2000) *Gene Ther.* 7:1744-52; Yang, N. S. (1992) *Crit. Rev. Biotechnol.* 12:335-56;

5 Alt, M. (1995) *J. Hepatol.* 23:746-58; Brody, S. L. y Crystal, R. G. (1994) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 716:90-101; Strayer, D. S. (1999) *Expert Opin. Investig. Drugs* 8:2159-2172; Smith-Arica, J. R. y Bartlett, J. S. (2001) *Curr. Cardiol. Rep.* 3:43-49 y Lee, H. C. et ál. (2000) *Nature* 408:483-8.

10

G. CÉLULAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS

La presente invención contempla, en modalidades particulares, células genéticamente modificadas para expresar los CAR contemplados en la presente para uso en el tratamiento de

15 afecciones relacionadas con células B. Tal como se utiliza en la presente, el término «genéticamente alteradas» o «genéticamente modificadas» hace referencia a la adición de material genético adicional en forma de ADN o ARN en el material genético total en una célula. Los términos «células

20 genéticamente modificadas», «células modificadas» y «células redirigidas» se utilizan de forma intercambiable. Tal como se utiliza en la presente, el término «terapia génica» hace referencia a la introducción de material genético adicional en forma de ADN o ARN en el material genético total en una célula

que restaura, corrige o modifica la expresión de un gen o con el fin de expresar un polipéptido terapéutico, p. ej., un CAR.

En modalidades particulares, los CAR contemplados en la presente se introducen y expresan en células efectoras inmunes para redirigir su especificidad hacia un antígeno objetivo de interés, p. ej., un polipéptido de BCMA. Una «célula efectora inmune» es cualquier célula del sistema inmunológico con una o más funciones efectoras (p. ej., actividad de destrucción de células citotóxicas, secreción de citocinas, inducción de ADCC y/o CDC).

Las células efectoras inmunes de la invención pueden ser autólogas/autogénicas («propias») o no autólogas («no propias», p. ej., alogénicas, singénicas o xenogénicas).

«Autólogo/a», tal como se utiliza en la presente, hace referencia a células del mismo sujeto.

«Alogénico/a», tal como se utiliza en la presente, hace referencia a células de la misma especie que difieren genéticamente con respecto a la célula en comparación.

«Singénico/a», tal como se utiliza en la presente, hace

referencia a células de un sujeto diferente que son genéticamente idénticas a la célula en comparación.

«Xenogénico/a», tal como se utiliza en la presente, hace
5 referencia a células de especies diferentes con respecto a la célula en comparación. En modalidades preferidas, las células de la invención son alogénicas.

Las células efectoras inmunes ilustrativas que se utilizan con
10 los CAR contemplados en la presente incluyen linfocitos T. Los términos «célula T» o «linfocito T» se reconocen en la técnica y pretenden incluir timocitos, linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros, linfocitos T en reposo o linfocitos T activados. Una célula T puede ser una célula T auxiliar (Th,
15 por su sigla en inglés), por ejemplo, una célula T auxiliar 1 (Th1) o T auxiliar 2 (Th2). La célula T puede ser una célula T auxiliar HTL, célula T CD4⁺) célula T CD4⁺, una célula T citotóxica (CTL, célula T CD8⁺), célula T CD4⁺CD8⁺, célula T CD4⁻CD8⁻ o cualquier otro subconjunto de células T. Otras
20 poblaciones ilustrativas de células T adecuadas para uso en modalidades particulares incluyen células T sin tratamiento y células T de memoria.

Como observará el experto en la técnica, también se pueden

utilizar otras células como células efectoras inmunes con los CAR descritos en la presente. En particular, las células efectoras inmunes también incluyen células NK, células NKT, neutrófilos y macrófagos. Las células efectoras inmunes también
5 incluyen progenitores de células efectoras en los que se puede diferenciar dichas células progenitoras en una célula efectora inmune *in vivo* o *in vitro*. Por lo tanto, en modalidades particulares, la célula efectora inmune incluye progenitores de células efectoras inmunes como células madre hematopoyéticas
10 (HSC, por su sigla en inglés) contenidas en la población CD34+ de células derivada de sangre de cordón umbilical, médula ósea o sangre periférica movilizada que, luego de administrarse a un sujeto, se diferencian en células efectoras inmunes maduras o cuya diferenciación en células efectoras inmunes maduras se
15 puede inducir *in vitro*.

Tal como se utiliza en la presente, las células efectoras inmunes genéticamente modificadas para incluir CAR específico del BCMA se pueden indicar como «células efectoras inmunes
20 redirigidas específicas del BCMA».

El término «célula CD34+», tal como se utiliza en la presente, hace referencia a una célula que expresa la proteína CD34 en su superficie celular. «CD34», tal como se utiliza en la presente,

hace referencia a una glicoproteína de superficie celular (p. ej., proteína sialomucina) que a menudo actúa como factor de adhesión entre células y que se encuentra implicada en el ingreso de la célula T en los nódulos linfáticos. La población
5 de células CD34+ contiene células madre hematopoyéticas (HSC) que, luego de administrarse a un paciente, se diferencian y contribuyen a todos los linajes hematopoyéticos, incluidas células T, células NK, células NKT, neutrófilos y células del linaje de monocitos/macrófagos.

10

La presente invención brinda métodos para realizar las células efectoras inmunes que expresan el CAR contemplado en la presente. En una modalidad, el método comprende transfectar o transducir células efectoras inmunes aisladas de un individuo,
15 de modo que las células efectoras inmunes expresen uno o más CAR, como se describe en la presente. En determinadas modalidades, las células efectoras inmunes se aíslan de un individuo y se modifican genéticamente sin manipulación adicional in vitro. Estas células luego pueden volver a
20 administrarse directamente al individuo. En otras modalidades, las células efectoras inmunes primero se activan y estimulan para proliferarse in vitro antes de modificarse genéticamente para expresar un CAR. En este sentido, las células efectoras inmunes pueden cultivarse antes y/o después de modificarse

genéticamente (es decir, transducirse o transfectarse para expresar un CAR contemplado en la presente).

En modalidades particulares, antes de la manipulación *in vitro*
5 o la modificación genética de las células efectoras inmunes descritas en la presente, la fuente de las células se obtiene de un sujeto. En modalidades particulares, las células efectoras inmunes modificadas por CAR comprenden células T. Se pueden obtener células T de diversas fuentes que incluyen, de
10 modo no taxativo, células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre de cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un lugar de infección, ascitis, efusión pleural, tejido del bazo y tumores. En determinadas modalidades, las células T se pueden obtener de
15 una unidad de sangre extraída de un sujeto utilizando cualquier cantidad de técnicas conocidas por el experto en la técnica, como sedimentación, p. ej., separación FICOLL™. En una modalidad, se obtienen células de la sangre en circulación de un individuo mediante aféresis. El producto de la aféresis
20 típicamente contiene linfocitos, incluidas células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En una modalidad, las células extraídas mediante aféresis se pueden lavar para retirar la fracción de plasma y colocar las células en un

amortiguador o medio adecuado para el procesamiento adicional. Las células se pueden lavar con PBS o con otra solución adecuada que carezca de calcio, magnesio y la mayoría, si no la totalidad, de cualquier otro catión divalente. Como observarán
5 los expertos en la técnica, una etapa de lavado puede estar acompañada por métodos conocidos por los expertos en la técnica, como uso de una centrífuga de flujo continuo semiautomática. Por ejemplo, el procesador celular Cobe 2991, el CytoMate de Baxter o similar. Luego del lavado, las células
10 se pueden volver a suspender en diversos amortiguadores biocompatibles u otra solución salina con o sin amortiguador. En determinadas modalidades, los componentes no deseados de la muestra de aféresis pueden retirarse en medio de cultivo resuspendido directamente en la célula.

15

En determinadas modalidades, las células T se aíslan de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por su sigla en inglés) mediante lisado de los glóbulos rojos y agotamiento de los monocitos, por ejemplo, con centrifugado a través de un
20 gradiente de PERCOLL™. También se puede aislar una subpoblación específica de células T con expresión de uno o más de los siguientes marcadores: CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA y CD45RO, mediante técnicas de selección positiva o negativa. En una modalidad, una subpoblación específica de células T con

expresión de CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA y CD45RO se aísla adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. Por ejemplo, el enriquecimiento de una población de células T mediante selección negativa se puede lograr con una
5 combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores superficiales exclusivos de las células seleccionadas de forma negativa. Un método para uso en la presente es clasificación celular y/o selección mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza un cóctel de anticuerpos
10 monoclonales dirigidos a marcadores superficiales celulares presentes en las células seleccionadas de forma negativa. Por ejemplo, para enriquecimiento de células CD4⁺ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales típicamente incluye anticuerpos de CD14, CD20, CD11b, CD16,
15 HLA-DR y CD8. También se pueden utilizar citometría de flujo y clasificación celular para aislar poblaciones celulares de interés para uso en la presente invención.

Las PMBC se pueden modificar genéticamente de forma directa
20 para expresar CAR, utilizando métodos contemplados en la presente. En determinadas modalidades, luego de aislar las PBMC, los linfocitos T se aíslan adicionalmente y, en determinadas modalidades, tanto los linfocitos T citotóxicos como auxiliares se pueden clasificar en subpoblaciones de

células T sin tratamiento, de memoria y efectoras, antes o después de la modificación genética y/o la expansión.

Las células CD8⁺ se pueden obtener utilizando métodos
5 estándares. En algunas modalidades, las células CD8⁺ se clasifican adicionalmente en células sin tratamiento, de memoria centrales y efectoras, identificando antígenos de la superficie celular asociados con cada uno de dichos tipos de células CD8⁺.

10

En determinadas modalidades, los linfocitos T de CD8⁺ sin tratamiento se caracterizan mediante expresión de marcadores fenotípicos de células T sin tratamiento que incluyen CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD 127 y CD45RA.

15

En modalidades particulares, las células T de memoria se encuentran presentes tanto en subconjuntos CD62L⁺ como CD62L⁻ de linfocitos de sangre periférica CD8⁺. Las PBMC se clasifican en fracciones CD62L⁻CD8⁺ y CD62L⁺CD8⁺ luego de la tinción con
20 anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L. En algunas modalidades, la expresión de marcadores fenotípicos de células T de memoria centrales incluyen CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 y CD127 y son negativas para granzima B. En algunas modalidades, las células T de memoria centrales son células T CD45RO⁺, CD62L⁺, CD8⁺.

En algunas modalidades, las células T efectoras son negativas para CD62L, CCR7, CD28 y CD127 y positivas para granzima B y perforina.

5

En determinadas modalidades, las células T CD4⁺ se clasifican adicionalmente en subpoblaciones. Por ejemplo, las células auxiliares CD4⁺ se pueden clasificar en células sin tratamiento, de memoria centrales y efectoras, identificando las poblaciones celulares con antígenos de superficie celular. Los linfocitos CD4⁺ se pueden obtener utilizando métodos estándares. En algunas modalidades, los linfocitos T CD4⁺ sin tratamiento son células T CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺ CD4⁺. En algunas modalidades, las células CD4⁺ de memoria centrales son positivas para CD62L y CD45RO. En algunas modalidades, las células CD4⁺ efectoras son negativas para CD62L y CD45RO.

Las células efectoras inmunes, como las células T, se pueden modificar genéticamente luego de aislamiento con métodos estándares o las células efectoras inmunes se pueden activar y expandir (o diferenciarse en el caso de progenitores) *in vitro* antes de modificarse genéticamente. En una modalidad particular, las células efectoras inmunes, como las células T, se modifican genéticamente con los receptores de antígenos

quiméricos contemplados en la presente (p. ej., se transducen con un vector viral que comprende un ácido nucleico que codifica un CAR) y luego se activan y expanden *in vitro*. En diversas modalidades, las células T se pueden activar y expandirse antes o después de la modificación genética para expresar un CAR, utilizando métodos descritos, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.º 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681 ; 7, 144,575; 7,067,318; 7, 172,869; 7,232,566; 7, 175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041 y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20060121005.

En términos generales, las células T se expanden mediante contacto con una superficie con un agente unido que estimule una señal asociada con el complejo de TCR CD3 y un ligando que estimule una molécula coestimuladora en la superficie de las células T. Las poblaciones de células T se pueden estimular mediante contacto con un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno de este o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, así como mediante contacto con un activador de proteína cinasa C (p. ej., briostatina) en conjunto con un ionóforo cálcico. La estimulación conjunta de moléculas accesorias en la superficie de células T también se encuentra contemplada.

En modalidades particulares, las PBMC o células T aisladas entran en contacto con un agente estimulador y agentes coestimuladores, como anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, generalmente unidos a una microesfera u otra superficie, en un medio de cultivo con citocinas adecuadas, como IL-2, IL-7 y/o IL-15. Para estimular la proliferación de células T CD4⁺ o células T CD8⁺, un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Se pueden utilizar ejemplos de anticuerpo anti-CD28 que incluyen 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diacione, Besancon, Francia), así como otros métodos comúnmente conocidos en la técnica (Berg et ál., *Transplant Proc.* 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et ál., *J. Exp. Med.* 190(9): 13191328, 1999; Garland et ál., *J. Immunol Meth.* 227(1 -2):53-63, 1999). Los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a la misma microesfera sirven como célula que presenta el antígeno (APC, por su sigla en inglés) «sustituta». En otras modalidades, las células T se pueden activar y estimular para proliferarse con células de alimentación y anticuerpos y citocinas adecuados, utilizando métodos como los descritos en US6040177; US5827642 y WO2012129514.

En otras modalidades, las APC artificiales (aAPC) se realizan mediante modificación de células K562, U937, 721.221, T2 y C1R para dirigir la expresión y secreción estables de diversas

citocinas y moléculas coestimuladoras. En una modalidad particular, se utilizan aAPC K32 o U32 para dirigir la expresión de una o más moléculas estimuladoras basadas en anticuerpo en la superficie de células AAPC. La expresión de

5 diversas combinaciones de genes en la aAPC permite la determinación exacta de los requisitos de activación de células T humanas, de modo de poder adaptar las aAPC para propagación óptima de subconjuntos de células T con requisitos de crecimiento específicos y funciones distintas. Las aAPC apoyan

10 el crecimiento ex vivo y la expansión a largo plazo de células T CD8 humanas funcionales sin requerir la adición de citoxinas exógenas, a diferencia del uso de APC naturales. Las poblaciones de células T se pueden expandir mediante aAPC que expresan diversas moléculas coestimuladoras y que incluyen, de

15 modo no taxativo, CD137L (4-1BBL), CD134L (OX40L) y/o CD80 o CD86. Por último, las APC brindan una plataforma eficaz para expandir células T genéticamente modificadas y mantener la expresión de CD28 en células T CD8. Las aAPC que se brindan en WO 03/057171 y US2003/0147869 se incorporan en la presente en

20 su totalidad mediante esta referencia.

En una modalidad, las células CD34⁺ se transducen con una construcción de ácido nucleico, de acuerdo con la invención. En determinadas modalidades, las células CD34⁺ transducidas se

diferencian en células efectoras inmunes maduras *in vivo* luego de la administración a un sujeto, generalmente el sujeto a partir del cual se aislaron las células originalmente. En otra modalidad, las células CD34⁺ se pueden estimular *in vitro* antes
5 de la exposición o después de la modificación genética con un CAR como se describe en la presente, con una o más de las siguientes citocinas: ligando de Flt-3 (FLT3), factor de célula madre (SCF, por su sigla en inglés), factor de crecimiento y diferenciación de megacariocitos (TPO), IL-3 e IL-6, de acuerdo
10 con métodos descritos previamente (Asheuer et ál., 2004; Imren, et ál., 2004).

La invención brinda una población de células efectoras inmunes modificadas para el tratamiento de cáncer, en la que las
15 células efectoras inmunes comprenden un CAR como se describe en la presente. Por ejemplo, se elabora una población de células efectoras inmunes modificadas a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de un paciente diagnosticado con neoplasia de células B como se describe en la
20 presente (donantes autólogos). Las PBMC forman una población heterogénea de linfocitos T que pueden ser CD4⁺, CD8⁺ o CD4⁺ y CD8⁺.

Las PBMC también pueden incluir otros linfocitos citotóxicos

como células NK o células NKT. Se puede introducir un vector de expresión con la secuencia de codificación de un CAR contemplado en la presente en una población de células T donantes humanas, células NK o células NKT. Las células T transducidas de forma exitosa que conllevan el vector de expresión se pueden clasificar utilizando citometría de flujo para aislar células T positivas para CD3 y luego propagarse adicionalmente para aumentar la cantidad de estas células T con expresión de proteína CAR además de activación celular con anticuerpos anti-CD3 y/o anticuerpos anti-CD28 e IL-2 o cualquier otro método conocido en la técnica, como se describe en otro punto en la presente. Se utilizan procedimientos estándares para crioconservación de células T con expresión de células T de proteínas CAR para almacenamiento y/o preparación para uso en un sujeto humano. En una modalidad, la transducción, el cultivo y/o la expansión in vitro de células T se realizan sin productos derivados de animales no humanos, como suero fetal bovino y suero bovino fetal. Dado que se modifica genéticamente una población heterogénea de PBMC, las células transducidas resultantes son una población heterogénea de células modificadas que comprende un BCMA dirigido a CAR como se contempla en la presente.

En otra modalidad, se puede utilizar una mezcla de, p. ej.,

uno, dos, tres, cuatro, cinco o más vectores de expresión diferentes en la modificación genética de una población donante de células efectoras inmunes, en la que cada vector codifica una proteína de receptor de antígeno quimérico diferente, como

5 se contempla en la presente. Las células efectoras inmunes modificadas resultantes forman una población mixta de células modificadas, en la que una proporción de las células modificadas expresa más de una proteína CAR diferente.

10 En una modalidad, la invención brinda un método para almacenar células efectoras inmunes con expresión de proteína CAR murinas, humanas o humanizadas y genéticamente modificadas que se dirigen a una proteína del BCMA, que comprende crioconservar las células efectoras inmunes de modo que las células

15 permanezcan viables luego del descongelado. Una fracción de las células efectoras inmunes que expresan las proteínas CAR se pueden crioconservar con métodos conocidos en la técnica para brindar una fuente permanente de dichas células para tratamiento futuro de pacientes que padezcan la afección

20 relacionada con células B. De necesitarse, las células efectoras inmunes transformadas y crioconservadas se pueden descongelar, cultivarse y expandirse para más células de este tipo.

Tal como se utiliza en la presente, «crioconservación» hace referencia a la conservación de células mediante enfriamiento hasta temperaturas por debajo de cero, como (típicamente) 77 K o -196°C (el punto de ebullición del nitrógeno líquido). Los
5 agentes de crioconservación se utilizan a menudo a temperaturas por debajo de cero para evitar que las células conservadas se dañen debido a congelamiento a bajas temperaturas o calentamiento hasta temperatura ambiente. Los agentes de crioconservación y las velocidades de enfriamiento óptimas
10 pueden brindar protección contra la lesión celular. Los agentes de crioconservación que se pueden utilizar incluyen, de modo no taxativo, sulfóxido de dimetilo (DMSO) (Lovelock y Bishop, Nature, 1959; 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, Nature, 1961; 190: 1204-1205), glicerol, polivinilpirrolidina (Rinfret, Ann. N.Y.
15 Acad. Sci., 1960; 85: 576) y polietilenglicol (Sloviter y Ravdin, Nature, 1962; 196: 48). La velocidad de enfriamiento preferida es 1°C a $3^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ Luego de al menos dos horas, las células T alcanzaron una temperatura de -80°C y se pueden colocar directamente en nitrógeno líquido (-196°C) para
20 almacenamiento permanente, como en un recipiente de almacenamiento criogénico a largo plazo.

H. MÉTODOS DE ELABORACIÓN DE CÉLULAS T

Las células T elaboradas con los métodos contemplados en la

presente brindan mejores composiciones para inmunoterapia adoptiva. Sin deseo de limitarse a ninguna teoría particular, se cree que las composiciones de células T elaboradas con los métodos contemplados en la presente se encuentran imbuidas con

5 propiedades superiores, incluida una mayor supervivencia, expansión en ausencia relativa de diferenciación y persistencia *in vivo*. En una modalidad, un método para elaborar células T comprende poner en contacto las células con uno o más agentes que modulen una vía de señalización de células PI3K. En una

10 modalidad, un método para elaborar células T comprende poner en contacto las células con uno o más agentes que modulen una vía de señalización de células PI3K/Akt/mTOR. En diversas modalidades, las células T se pueden obtener de cualquier fuente y ponerse en contacto con el agente durante las fases de

15 activación y/o expansión del proceso de elaboración. Las composiciones de células T resultantes se enriquecen en células T potentes en su desarrollo con la capacidad de proliferarse y expresar uno o más de los siguientes biomarcadores: CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197 y CD38. En una modalidad,

20 las poblaciones de células con células T tratadas con uno o más inhibidores de PI3K se enriquecen para una población de células T CD8+ con expresión conjunta de uno o más o todos los siguientes biomarcadores: CD62L, CD127, CD197 y CD38.

En una modalidad, se elaboran células T modificadas que comprenden niveles mantenidos de proliferación y menor diferenciación. En una modalidad particular, las células T se elaboran mediante estimulación de células T para activarse y proliferarse en presencia de una o más señales estimuladoras y un agente que es un inhibidor de una vía de señalización celular PI3K.

Las células T luego se pueden modificar para expresar un CAR anti-BCMA. En una modalidad, las células T se modifican mediante transducción de las células T con un vector viral que comprende un CAR anti-BCMA contemplado en la presente. En una modalidad específica, las células T se modifican antes de la estimulación y activación en presencia de un inhibidor de una vía de señalización celular de PI3K. En otra modalidad específica, las células T se modifican después de la estimulación y activación en presencia de un inhibidor de una vía de señalización celular de PI3K. En una modalidad particular, las células T se modifican dentro de las 12 horas, 24 horas, 36 horas o 48 horas de la estimulación y activación en presencia de un inhibidor de una vía de señalización celular de PI3K.

Luego de activar las células T, las células se cultivan para

proliferarse. Las células T se pueden cultivar durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, al menos 2 semanas, al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses o más con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más rondas de expansión.

5

En diversas modalidades, las composiciones de células T se elaboran en presencia de uno o más inhibidores de la vía de PI3K. Los inhibidores pueden dirigirse a una o más actividades en la vía o a una única actividad. Sin deseo de limitarse a
10 ninguna teoría particular, se contempla que el tratamiento o contacto de las células T con uno o más inhibidores de la vía de PI3K durante las fases de estimulación, activación y/o expansión del proceso de elaboración aumenta preferentemente las células T jóvenes, con lo cual se producen composiciones de
15 células T terapéuticas superiores.

En una modalidad particular, se brinda un método para aumentar la proliferación de células T que expresan un receptor de células T modificado. Estos métodos pueden comprender, por
20 ejemplo, extracción de una fuente de células T de un sujeto, estimulación y activación de las células T en presencia de uno o más inhibidores de la vía PI3K, modificación de las células T para expresar un CAR anti-BCMA, p. ej., CAR anti-BCMA02 y expansión de las células T en cultivo.

En una modalidad determinada, un método para producir poblaciones de células T enriquecidas para expresión de uno o más de los siguientes marcadores: CD62L, CCR7, CD28, CD27, 5 CD122, CD127, CD197 y CD38. En una modalidad, las células T jóvenes comprenden uno o más o todos los siguientes marcadores biológicos: CD62L, CD127, CD197 y CD38. En una modalidad, se brindan células T jóvenes que carecen de expresión de CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 y LAG3. Tal como se indicó en 10 otro punto en la presente, los niveles de expresión de biomarcadores de células T jóvenes es relativo a los niveles de expresión de dichos marcadores en poblaciones de células efectoras inmunes o células T más diferenciadas.

15 En una modalidad, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se utilizan como fuente de células T en los métodos de elaboración de células T contemplados en la presente. Las PBMC forman una población heterogénea de linfocitos T que pueden ser CD4⁺, CD8⁺ o CD4⁺ y CD8⁺ y pueden 20 incluir otras células mononucleares como monocitos, células B, células NK y células NKT. Se puede introducir un vector de expresión con un polinucleótido que codifica un CAR o TCR modificado contemplado en la presente en una población de células T donantes humanas, células NK o células NKT. Las

células T transducidas de forma exitosa que conllevan el vector de expresión se pueden clasificar utilizando citometría de flujo para aislar células T positivas para CD3 y luego propagarse adicionalmente para aumentar la cantidad de células T modificadas además de activación celular con anticuerpos anti-CD3 y/o anticuerpos anti-CD28 e IL-2, IL-7 y/o IL-15 o cualquier otro método conocido en la técnica, como se describe en otro punto en la presente.

Los métodos de elaboración contemplados en la presente pueden comprender además crioconservación de células T modificadas para almacenamiento y/o preparación para uso en un sujeto humano. Las células T se crioconservan para que las células permanezcan viables luego de descongelarse. De necesitarse, las células efectoras inmunes transformadas y crioconservadas se pueden descongelar, cultivarse y expandirse para más células de este tipo. Tal como se utiliza en la presente, «crioconservación» hace referencia a la conservación de células mediante enfriamiento hasta temperaturas por debajo de cero, como (típicamente) 77 K o -196 °C (el punto de ebullición del nitrógeno líquido). Los agentes de crioconservación se utilizan a menudo a temperaturas por debajo de cero para evitar que las células conservadas se dañen debido a congelamiento a bajas temperaturas o calentamiento hasta temperatura ambiente. Los

agentes de crioconservación y las velocidades de enfriamiento óptimas pueden brindar protección contra la lesión celular. Los agentes de crioconservación que se pueden utilizar incluyen, de modo no taxativo, sulfóxido de dimetilo (DMSO) (Lovelock y Bishop, *Nature*, 1959; 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, *Nature*, 1961; 190: 1204-1205), glicerol, polivinilpirrolidina (Rinfret, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1960; 85: 576) y polietilen glicol (Sloviter y Ravdin, *Nature*, 1962; 196: 48). La velocidad de enfriamiento preferida es 1 °C a 3 °C/minuto. Luego de al menos dos horas, las células T alcanzaron una temperatura de -80 °C y se pueden colocar directamente en nitrógeno líquido (-196 °C) para almacenamiento permanente, como en un recipiente de almacenamiento criogénico a largo plazo.

15 **1. CÉLULAS T**

La presente invención contempla la elaboración de composiciones mejoradas de células T de CAR. Las células T que se utilizan para producción de células T CAR pueden ser autólogas/autogénicas («propias») o no autólogas («no propias», p. ej., alogénicas, singénicas o xenogénicas). En modalidades preferidas, las células T se obtienen de un sujeto mamífero. En una modalidad más preferida, las células T se obtienen de un sujeto primate. En la modalidad más preferida, las células T se obtienen de un sujeto humano.

Se pueden obtener células T de diversas fuentes que incluyen, de modo no taxativo, células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre
5 de cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un lugar de infección, ascitis, efusión pleural, tejido del bazo y tumores. En determinadas modalidades, las células T se pueden obtener de una unidad de sangre extraída de un sujeto utilizando cualquier cantidad de técnicas conocidas por el experto en la técnica,
10 como sedimentación, p. ej., separación FICOLL™. En una modalidad, se obtienen células de la sangre en circulación de un individuo mediante aféresis. El producto de la aféresis típicamente contiene linfocitos, incluidas células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos
15 nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En una modalidad, las células extraídas mediante aféresis se pueden lavar para retirar la fracción de plasma y colocar las células en un amortiguador o medio adecuado para el procesamiento adicional. Las células se pueden lavar con PBS o con otra solución
20 adecuada que carezca de calcio, magnesio y la mayoría, si no la totalidad, de cualquier otro catión divalente. Como observarán los expertos en la técnica, una etapa de lavado puede estar acompañada por métodos conocidos por los expertos en la técnica, como uso de una centrífuga de flujo continuo

semiautomática. Por ejemplo, el procesador celular Cobe 2991, el CytoMate de Baxter o similar. Luego del lavado, las células se pueden volver a suspender en diversos amortiguadores biocompatibles u otra solución salina con o sin amortiguador.

- 5 En determinadas modalidades, los componentes no deseados de la muestra de aféresis pueden retirarse en medio de cultivo resuspendido directamente en la célula.

En modalidades particulares, en los métodos de elaboración
10 contemplados en la presente se utiliza una población de células con células T, p. ej., PBMC. En otras modalidades, en los métodos de elaboración contemplados en la presente se utiliza una población aislada o purificada de células T. Las células se pueden aislar de células mononucleares de sangre periférica
15 (PBMC) mediante lisado de los glóbulos rojos y agotamiento de los monocitos, por ejemplo, con centrifugado a través de un gradiente de PERCOLL™. En algunas modalidades, luego de aislar las PBMC, tanto los linfocitos T citotóxicos como auxiliares se pueden clasificar en subpoblaciones de células T sin
20 tratamiento, de memoria y efectoras, antes o después de la activación, expansión y/o modificación genética.

También se puede aislar una subpoblación específica de células T con expresión de uno o más de los siguientes marcadores: CD3,

CD4, CD8, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62, CD127 y HLA-DR se pueden aislar adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. En una modalidad, una subpoblación específica de células T que expresa uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en i) CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197 o ii) CD38 o CD62L, CD127, CD197 y CD38 se aísla adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. En diversas modalidades, las composiciones de células T elaboradas no expresan o no expresan de forma sustancial uno o más de los siguientes marcadores: CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 y LAG3.

En una modalidad, la expresión de uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD62L, CD127, CD197 y CD38 aumenta al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces o más en comparación con una población de células T activadas y expandidas sin un inhibidor de PI3K.

20

En una modalidad, la expresión de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 y LAG3 disminuye al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al

menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces o más en comparación con una población de células T activadas y expandidas con un inhibidor de PI3K.

5

En una modalidad, los métodos de fabricación contemplados en la presente aumentan la cantidad de células T de CAR que comprenden uno o más marcadores de células T sin tratamiento o potentes en su desarrollo. Sin deseo de limitarse a ninguna

10 teoría particular, los inventores de la presente creen que el tratamiento de una población de células que comprende células T con uno o más inhibidores de PI3K produce un aumento una expansión de células T potentes en su desarrollo y brinda una inmunoterapia con células T de CAR adoptiva más fuerte y eficaz

15 en comparación con las terapias con células T de CAR existentes.

Los ejemplos ilustrativos de marcadores de células T sin tratamiento o potentes en su desarrollo que aumentaron en

20 células T elaboradas utilizando los métodos contemplados en la presente incluyen, de modo no taxativo, CD62L, CD127, CD197 y CD38. En modalidades particulares, las células T sin tratamiento no expresan o no expresan de forma sustancial uno o más de los siguientes marcadores: CD57, CD244, CD160, PD-1,

BTLA, CD45RA, CTLA4, TIM3 y LAG3.

Con respecto a las células T, las poblaciones de células T que resultan de las diversas metodologías de expansión contempladas en la presente pueden tener diversas propiedades fenotípicas específicas, dependiendo de las condiciones utilizadas. En diversas modalidades, las poblaciones de células T expandidas comprenden uno o más de los siguientes marcadores fenotípicos: CD62L, CD127, CD197, CD38 y HLA-DR.

10

En una modalidad, estos marcadores fenotípicos incluyen mayor expresión de uno o más o todos de CD62L, CD127, CD197 y CD38. En modalidades particulares, se expanden los linfocitos T de CD8⁺ caracterizados mediante expresión de marcadores fenotípicos de células T sin tratamiento que incluyen CD62L, CD127, CD197 y CD38.

15

En modalidades particulares, se expanden las células T caracterizadas mediante expresión de marcadores fenotípicos de células T de memoria central que incluyen CD45RO, CD62L, CD127, CD197 y CD38 y negativos para granzima B. En algunas modalidades, las células T de memoria central son células T CD45RO⁺, CD62L⁺, CD8⁺.

20

En determinadas modalidades, se expanden los linfocitos T de CD4⁺ caracterizados mediante expresión de marcadores fenotípicos de células CD4⁺ sin tratamiento que incluyen CD62L y negativos para la expresión de CD45RA y/o CD45RO. En algunas
5 modalidades, las células CD4⁺ caracterizadas por la expresión de marcadores fenotípicos de células CD4⁺ de memoria central, incluidas positivas para CD62L y CD45RO. En algunas modalidades, las células CD4⁺ efectoras son positivas para CD62L y negativas para CD45RO.

10

En determinadas modalidades, las células T se aíslan de un individuo y se activan y estimulan para proliferarse *in vitro* antes de modificarse genéticamente para expresar un CAR anti-BCMA. En este sentido, las células T pueden cultivarse antes
15 y/o después de modificarse genéticamente (es decir, transducirse o transfectarse para expresar un CAR anti-BCMA contemplado en la presente).

2. ACTIVACIÓN Y EXPANSIÓN

20 Para lograr dosis terapéuticas suficientes de composiciones de células T, las células T a menudo se someten a una o más rondas de estimulación, activación y/o expansión. Las células T se pueden activar y expandir generalmente utilizando métodos descritos, por ejemplo, en las patentes estadounidenses

6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358;
6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869;
7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514 y
6,867,041, cada una de las cuales se incorpora a la presente en
5 su totalidad mediante esta referencia. Las células T
modificadas para expresar un CAR anti-BCMA se pueden activar y
expandir antes y/o después de modificar las células T.
Asimismo, las células T se pueden poner en contacto con uno o
más agentes que modulen la vía de señalización celular de PI3K
10 antes, durante y/o después de la activación y/o expansión. En
una modalidad, las células T fabricadas con los métodos
contemplados en la presente experimentan una, dos, tres, cuatro
o cinco o más rondas de activación y expansión, cada una de las
cuales puede incluir uno o más agentes que modulan la vía de
15 señalización celular de PI3K.

En una modalidad, se presenta un ligando coestimulador en una
célula que presenta antígeno (p. ej., una aAPC, célula
dendrítica, célula B y similares) que se une de forma
20 específica a una molécula coestimuladora cognada en una célula
T, con lo cual se brinda una señal que, además de la señal
principal que brinda, por ejemplo, la unión de un complejo
TCR/CD3, media una respuesta deseada a la célula T. Los
ligandos coestimuladores adecuados incluyen, de modo no

taxativo, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L 1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulador inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM, por su sigla en inglés), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor beta de linfotoxina, ILT3, ILT4, un agonista o anticuerpo que se une al receptor del ligando Toll y un ligando que se une de forma específica con B7-H3.

En una modalidad particular, un ligando coestimulador comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une de forma específica a una molécula coestimuladora presente en una célula T que incluye, de modo no taxativo, CD27, CD28, 4- IBB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado con la función del linfocito (LFA-1, por su sigla en inglés), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une de forma específica con CD83.

Los ligandos coestimuladores adecuados incluyen además antígenos objetivo, que pueden brindarse en forma soluble o expresarse en APC o aAPC que se unen a CAR o TCR modificados que se expresan en células T modificadas.

En diversas modalidades, un método para elaborar células T contemplado en la presente comprende activar una población de

células con células T y expandir la población de células T. La activación de células T se puede lograr brindando una señal de estimulación primaria a través del complejo de TCR/CD3 de la célula T o mediante estimulación de la proteína de superficie CD2 y brindando una señal coestimuladora secundaria a través de una molécula accesoria, p. ej., CD28.

El complejo de TCR/CD3 puede estimularse mediante contacto de la célula T con un agente de unión de CD3 adecuado, p. ej., un ligando de CD3 o un anticuerpo monoclonal anti-CD3. Los ejemplos ilustrativos de anticuerpos CD3 incluyen, de modo no taxativo, OKT3, G19-4, BC3 y 64.1.

En otra modalidad, se puede utilizar un agente de unión a CD2 para brindar una señal de estimulación primaria a las células T. Los ejemplos ilustrativos de agentes de unión a CD2 incluyen, de modo no taxativo, ligandos de CD2 y anticuerpos anti-CD2, p. ej., el anticuerpo T11.3 en combinación con el anticuerpo T11.1 o T11.2 (Meuer, S. C. et ál. (1984) *Cell* 36:897-906) y el anticuerpo 9.6 (que reconoce el mismo epítipo que TI 1.1) en combinación con el anticuerpo 9-1 (Yang, S. Y. et ál. (1986) *J. Immunol.* 137:1097-1100). También se pueden utilizar otros anticuerpos que se unan a los mismos epítipos que cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente. Los

anticuerpos o las combinaciones de anticuerpos adicionales se pueden preparar e identificar con técnicas estándar como se describe en otro punto en la presente.

5 Además de la señal de estimulación primaria que se brinda a través del complejo de TCR/CD3 o mediante CD2, la inducción de respuestas de células T requiere una segunda señal coestimuladora. En modalidades particulares, se puede utilizar un agente de unión a CD28 para brindar una señal
10 coestimuladora. Los ejemplos ilustrativos de agentes de unión a CD28 incluyen, de modo no taxativo: ligandos de CD 28 naturales, p. ej., ligando natural de CD28 (p. ej., un miembro de la familia B7 de proteínas, como B7-1(CD80) y B7-2 (CD86) y anticuerpo monoclonal anti-CD28 o fragmento de este que puede
15 reticular la molécula CD28, p. ej., los anticuerpos monoclonales 9.3, B-T3, XR-CD28, KOLT-2, 15E8, 248.23.2 y EX5.3D10.

En una modalidad, la molécula que brinda la señal de
20 estimulación primaria, por ejemplo, una molécula que brinda estimulación a través del complejo de TCR/CD3 o CD2 y la molécula coestimuladora se acoplan a la misma superficie.

En determinadas modalidades, los agentes de unión que brindan

señales estimuladoras y coestimuladoras se ubican en la superficie de una célula. Esto se puede lograr transfectando o transduciendo una célula con un ácido nucleico que codifica el agente de unión en una forma adecuada para su expresión en la
5 superficie celular o, de forma alternativa, mediante acoplamiento de un agente de unión a la superficie celular.

En otra modalidad, la molécula que brinda la señal de estimulación primaria, por ejemplo, una molécula que brinda
10 estimulación a través del complejo de TCR/CD3 o CD2 y la molécula coestimuladora se expresan en células que presentan el antígeno.

En una modalidad, la molécula que brinda la señal de
15 estimulación primaria, por ejemplo, una molécula que brinda estimulación a través del complejo de TCR/CD3 o CD2 y la molécula coestimuladora se brindan en superficies separadas.

En una modalidad determinada, uno de los agentes de unión que
20 brinda señales estimuladoras y coestimuladoras es soluble (se brinda en solución) y el o los otros agentes se brindan en una o más superficies.

En una modalidad particular, los agentes de unión que brindan

señales estimuladoras y coestimuladoras se brindan ambos en forma soluble (en solución).

En diversas modalidades, los métodos para elaborar las células T contemplados en la presente comprenden activar las células T con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28.

Las composiciones de células T elaboradas con los métodos contemplados en la presente comprenden células T activadas y/o expandidas en presencia de uno o más agentes que inhiben una vía de señalización celular de PI3K. Las células T modificadas para expresar un CAR anti-BCMA se pueden activar y expandir antes y/o después de modificar las células T. En modalidades particulares, una población de células T se activa, modifica para expresar un CAR anti-BCMA y luego se cultiva para expansión.

En una modalidad, las células T elaboradas con los métodos contemplados en la presente comprenden una mayor cantidad de células T que expresan marcadores que indican un potencial de proliferación elevado y la capacidad de autorrenovarse, pero no expresan o expresan marcadores sustancialmente indetectables de diferenciación de células T. Estas células T se pueden activar de forma repetida y expandirse de forma potente y así brindar

una mejor composición de células T terapéutica.

En una modalidad, una población de células T activada y
expandida en presencia de uno o más agentes que inhiben una vía
5 de señalización celular de PI3K se expande al menos 1.5 veces,
al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos
5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces,
al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al
menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 250 veces, al
10 menos 500 veces, al menos 1000 veces o más, en comparación con
una población de células T activadas y expandidas sin un
inhibidor de PI3K.

En una modalidad, una población de células T caracterizada por
15 la expresión de células T jóvenes marcadoras activadas y
expandidas en presencia de uno o más agentes que inhiben una
vía de señalización celular de PI3K se expande al menos 1.5
veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al
menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8
20 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces,
al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 250 veces, al
menos 500 veces, al menos 1000 veces o más, en comparación con
la población de células T activadas y expandidas sin un
inhibidor de PI3K.

En una modalidad, las células T expandidas activadas con los métodos contemplados en la presente comprenden además cultivo de una población de células que comprende células T durante
5 varias horas (alrededor de 3 horas) a alrededor de 7 días a alrededor de 28 días o cualquier valor horario entero intermedio. En otra modalidad, la composición de células T puede cultivarse durante 14 días. En una modalidad particular, las células T se cultivan durante alrededor de 21 días. En otra
10 modalidad, las composiciones de células T se cultivan durante alrededor de 2-3 días. También pueden ser deseables diversos ciclos de estimulación/activación/expansión, por lo que el tiempo de cultivo de las células T puede ser de 60 días o más.

15 En modalidades particulares, las condiciones adecuadas para el cultivo de células T incluyen un medio adecuado (p. ej., medio esencial mínimo o medio RPMI 1640 o X-vivo 15 (Lonza)) y uno o más factores necesarios para proliferación y viabilidad que incluyen, de modo no taxativo, suero (p. ej., suero humano o
20 bovino fetal), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, IL-7, IL-21, GM-CSF, IL- 10, IL- 12, IL-15, TGF β y TNF- α o cualquier otro aditivo adecuado para el crecimiento de células conocido por el experto en la técnica.

- Otros ejemplos ilustrativos del medio de cultivo celular incluyen, de modo no taxativo, RPMI 1640, Clicks, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 1 5 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos agregados, piruvato sódico y vitaminas, libres de suero o suplementados con una cantidad adecuada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas y/o una cantidad de citocina/s suficiente para el crecimiento y la expansión de células T.
- 10 Los ejemplos ilustrativos de otros aditivos para expansión de células T incluyen, de modo no taxativo, tensioactivo, piasminato, amortiguadores de pH, como HEPES y agentes de reducción como N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol.
- 15 Se incluyen antibióticos, p. ej., penicilina y estreptomycin, solamente en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se deben infundir en un sujeto. Las células objetivo se mantienen en condiciones necesarias para sustentar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura adecuada (p. ej., 37
- 20 °C) y atmósfera adecuada (p. ej., aire más CO₂ al 5 %).

En modalidades particulares, las PBMC o células T aisladas entran en contacto con un agente estimulador y agentes coestimuladores, como anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28,

generalmente unidos a una microesfera u otra superficie, en un medio de cultivo con citocinas adecuadas, como IL-2, IL-7 y/o IL-15.

5 En otras modalidades, las APC artificiales (aAPC) se realizan mediante modificación de células K562, U937, 721.221, T2 y C1R para dirigir la expresión y secreción estables de diversas citocinas y moléculas coestimuladoras. En una modalidad particular, se utilizan aAPC K32 o U32 para dirigir la
10 expresión de una o más moléculas estimuladoras basadas en anticuerpo en la superficie de células AAPC. Las poblaciones de células T se pueden expandir mediante aAPC que expresan diversas moléculas coestimuladoras y que incluyen, de modo no taxativo, CD137L (4-1BBL), CD134L (OX40L) y/o CD80 o CD86. Por
15 último, las APC brindan una plataforma eficaz para expandir células T genéticamente modificadas y mantener la expresión de CD28 en células T CD8. Las aAPC que se brindan en WO 03/057171 y US2003/0147869 se incorporan en la presente en su totalidad mediante esta referencia.

20

3. AGENTES

En diversas modalidades, se brinda un método para elaborar células T que expande células T potentes en su desarrollo o no diferenciadas que comprende poner en contacto células T con un

agente que modula una vía de PI3K en las células. En diversas modalidades, se brinda un método para elaborar células T que expande células T potentes en su desarrollo o no diferenciadas que comprende poner en contacto células T con un agente que
5 modula una vía de PI3K/AKT/mTOR en las células. Las células pueden entrar en contacto antes, durante y/o después de la activación y expansión. Las composiciones de células T retienen una potencia de célula T suficiente para poder someterse a múltiples rondas de expansión sin aumento sustancial en la
10 diferenciación.

Tal como se utilizan en la presente, los términos «modular», «modulador» o «agente modulador» o términos comparables hacen referencia a la capacidad de un agente de provocar un cambio en
15 una vía de señalización celular. Un modulador puede aumentar o disminuir una cantidad, actividad de un componente de la vía o aumentar o disminuir un efecto o resultado deseado de una vía de señalización celular. En una modalidad, el modulador es un inhibidor. En otra modalidad, el modulador es un activador.

20

Un «agente» hace referencia a un compuesto, una molécula pequeña, p. ej., molécula orgánica pequeña, ácido nucleico, polipéptido o un fragmento, una isoforma, una variante, un análogo o derivado de estos que se utiliza en la modulación de

una vía de PI3K/AKT/mTOR.

Una «molécula pequeña» hace referencia a una composición con un peso molecular menor a alrededor de 5 kD, menor a alrededor de 4 kD, menor a alrededor de 3 kD, menor a alrededor de 2 kD, menor a alrededor de 1 kD o menor a alrededor de .5 kD. Las moléculas pequeñas pueden comprender ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, peptoides, carbohidratos, lípidos, componentes de estos u otras moléculas orgánicas o inorgánicas. En la técnica se conocen las genotecas de mezclas químicas y/o biológicas, como fúngicas, bacterianas o extractos de algas y se pueden analizar con cualquiera de los ensayos de la invención. Se pueden encontrar ejemplos de métodos para la síntesis de genotecas moleculares en: (Carell et ál., 1994a; Carell et ál., 1994b; Cho et ál., 1993; DeWitt et ál., 1993; Gallop et ál., 1994; Zuckermann et ál., 1994).

Un «análogo» hace referencia a un compuesto orgánico pequeño, un nucleótido, una proteína o un polipéptido que posee actividad o funciones similares o idénticas al compuesto, el nucleótido, la proteína o el polipéptido o compuesto con la actividad deseada de la presente invención, pero no comprende necesariamente una secuencia o estructura similar o idéntica a la secuencia o estructura de la modalidad preferida.

Un «derivado» hace referencia a un compuesto, una proteína o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína original o un polipéptido alterado mediante introducción de sustituciones, eliminaciones o adiciones de residuos de aminoácidos o un ácido nucleico o nucleótido modificado mediante introducción de sustituciones o eliminaciones, adiciones o mutaciones de nucleótidos. El ácido nucleico, nucleótido, proteína o polipéptido derivado posee una función similar o idéntica al polipéptido original.

En diversas modalidades, el agente que modula la vía de PI3K activa un componente de la vía. Un «activador» o «agonista» hace referencia a un agente que promueve, aumenta o induce una o más actividades de una molécula en una vía de PI3K/AKT/mTOR que incluye, de modo no taxativo, una molécula que inhibe una o más actividades de una PI3K.

En diversas modalidades, el agente que modula una vía de PI3K inhibe un componente de la vía. Un «inhibidor» o «antagonista» hace referencia a un agente que inhibe, disminuye o reduce una o más actividades de una molécula en una vía de PI3K incluida, de modo no taxativo, una PI3K. En una modalidad, el inhibidor es un inhibidor de molécula doble. En una modalidad particular,

el inhibidor puede inhibir una clase de moléculas con actividades iguales o sustancialmente similares (un inhibidor pan) o puede inhibir de forma específica la actividad de una molécula (un inhibidor selectivo o específico). La inhibición
5 también puede ser reversible o irreversible.

En una modalidad, el inhibidor tiene una IC₅₀ de al menos 1 nM, al menos 2 nM, al menos 5 nM, al menos 10 nM, al menos 50 nM, al menos 100 nM, al menos 200 nM, al menos 500 nM, al menos 1
10 µM, al menos 10 µM, al menos 50 µM o al menos 100 µM. Las determinaciones de IC₅₀ se pueden lograr utilizando cualquier técnica convencional conocida en la técnica. Por ejemplo, una IC₅₀ se puede determinar midiendo la actividad de una enzima específica en presencia de un espectro de concentraciones del
15 inhibidor que en estudio. Los valores obtenidos de forma experimental de la actividad enzimática luego se grafican en función de las concentraciones de inhibidor utilizadas. La concentración del inhibidor que muestra 50 % de actividad enzimática (en comparación con la actividad en ausencia de
20 cualquier inhibidor) se toma como el valor de «IC₅₀». De forma análoga, se pueden definir otras concentraciones inhibidoras mediante determinaciones de actividad adecuadas.

En diversas modalidades, las células T entran en contacto o se

tratan o cultivan con uno o más moduladores de una vía de PI3K a una concentración de al menos 1 nM, al menos 2 nM, al menos 5 nM, al menos 10 nM, al menos 50 nM, al menos 100 nM, al menos 200 nM, al menos 500 nM, al menos 1 μ M, al menos 10 μ M, al menos 50 μ M, al menos 100 μ M o al menos 1 M.

En modalidades particulares, las células T se pueden poner en contacto o tratarse o cultivarse con uno o más moduladores de una vía de PI3K durante al menos 12 horas, 18 horas, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, al menos 2 semanas, al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses o más con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más rondas de expansión.

a. Vía de PI3K/Akt/mTOR

15

El objetivo fosfatidil-inositol-3 cinasa/Akt/mamífero de la vía de rapamicina sirve como conducto para integrar la señalización del factor de crecimiento con proliferación, diferenciación, metabolismo y supervivencia celular. Las PI3K son una familia de cinasas lipídicas intracelulares altamente conservadas. Las PI3K de clase IA se activan mediante receptores tirosina cinasa (RTK, por su sigla en inglés) del factor de crecimiento, de forma directa o mediante interacción con la familia de moléculas adaptadoras del sustrato receptor de insulina. Esta

20

actividad genera la producción de fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato (PIP3, por su sigla en inglés), un regulador de serina/treonina cinasa Akt. El mTOR actúa a través de la vía de PI3K canónica mediante 2 complejos distintos, cada uno
5 caracterizado por diferentes compañeros de unión que confieren distintas actividades. El mTORC1 (mTOR en complejo con PRAS40, raptor y mLST8/GbL) actúa como efector corriente abajo de la señalización de PI3K/Akt y así enlazan señales del factor de crecimiento con traducción proteica, crecimiento, proliferación
10 y supervivencia celular. El mTORC2 (mTOR en complejo con rictor, mSIN1, protor y mLST8) actúa como activador corriente arriba de Akt.

Luego de activación de PI3K mediada por el receptor del factor
15 de crecimiento, se recluta Akt en la membrana a través de la interacción de su dominio de homología pleckstrina con PIP3, con lo cual se expone su bucle de activación y se permite la fosforilación en treonina 308 (Thr308) mediante la proteína cinasa 1 dependiente de fosfoinositido constitutivamente activo
20 (PDK1, por su sigla en inglés). Para activación máxima, la Akt también se fosforila mediante mTORC2, en la serina 473 (Ser473) de su motivo hidrofóbico del extremo C. También se ha demostrado que el ADN-PK y HSP son importantes en la regulación de la actividad Akt. La Akt activa mTORC1 a través de

fosforilación inhibidora de TSC2, que junto con TSC1 regula de forma negativa mTORC1 mediante inhibición de la GTPasa Rheb, un regulador positivo de mTORC1. mTORC1 tiene 2 sustratos bien definidos, p70S6K (indicado en lo sucesivo como S6K1) y 4E-BP1, 5 ambos reguladores esenciales de la síntesis de proteínas. Por lo tanto, mTORC1 es un importante efector corriente abajo de PI3K, que vincula la señalización del factor de crecimiento con traducción de proteína y proliferación celular.

10 b. Inhibidores de PI3K

Tal como se utiliza en la presente, el término «inhibidor de PI3K» hace referencia a un ácido nucleico, péptido, compuesto o molécula orgánicas pequeñas que se une a PI3K e inhibe al menos 15 una actividad de esta. Las proteínas PI3K se pueden dividir en tres clases, PI3K de clase 1, PI3K de clase 2 y PI3K de clase 3. Las PI3K de clase 1 existen como heterodímeros que consisten en una de cuatro subunidades catalíticas p110 (p110 α , p110 β , p110 δ y p110 γ) y una de dos familias de subunidades 20 reguladoras. Un inhibidor de PI3K de la presente invención se dirige preferentemente a los inhibidores de PI3K de clase 1. En una modalidad, un inhibidor de PI3K presenta selectividad con respecto a una o más isoformas de los inhibidores de PI3K de clase 1 (es decir, selectividad con respecto a p110 α , p110 β ,

p110 δ y p110 γ o uno o más de p110 α , p110 β , p110 δ y p110 γ). En otro aspecto, un inhibidor de PI3K no presenta selectividad de isoforma y se puede considerar un «inhibidor de pan-PI3K». En una modalidad, un inhibidor de PI3K compite con ATP por la
5 unión al dominio catalítico de PI3K.

En determinadas modalidades, un inhibidor de PI3K puede, por ejemplo, dirigirse a PI3K, así como a proteínas adicionales en la vía de PI3K-AKT-mTOR. En modalidades particulares, un
10 inhibidor de PI3K que se dirige tanto a mTOR como a PI3K se puede indicar como un inhibidor de mTOR o un inhibidor de PI3K. Un inhibidor de PI3K que se dirige solamente a PI3K puede indicarse como un inhibidor selectivo de PI3K. En una modalidad, puede comprenderse que un inhibidor selectivo de
15 PI3K hace referencia a un agente que presenta una concentración inhibidora del 50 % con respecto a PI3K, que es al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces o más menor a la IC₅₀ del inhibidor con respecto a mTOR y/u otras proteínas en la
20 vía.

En una modalidad particular, los ejemplos de inhibidores de PI3K inhiben PI3K con una IC₅₀ (concentración que inhibe el 50 % de la actividad) de alrededor de 200 nM o menos,

preferentemente alrededor de 100 nm o menos, incluso más preferentemente alrededor de 60 nM o menos, alrededor de 25 nM, alrededor de 10 nM, alrededor de 5 nM, alrededor de 1 nM, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 1 μ M, o menos. En una modalidad, un

5 inhibidor de PI3K inhibe PI3K con una IC₅₀ de entre alrededor de 2 nM y alrededor de 100 nm, más preferentemente entre alrededor de 2 nM y alrededor de 50 nM, incluso más preferentemente entre alrededor de 2 nM y alrededor de 15 nM.

10 Los ejemplos ilustrativos de inhibidores de PI3K adecuados para uso en los métodos de fabricación de células T contemplados en la presente incluyen, de modo no taxativo, BKM120 (inhibidor de PI3K de clase 1, Novartis), XL147 (inhibidor de PI3K de clase 1, Exelisis), (inhibidor de pan-PI3K, GlaxoSmithKline) y PX-866

15 (inhibidor de PI3K de clase 1, isoformas p110 α , p110 β y p110 γ , Oncothyreon).

Otros ejemplos ilustrativos de inhibidores selectivos de PI3K incluyen, de modo no taxativo, BYL719, GSK2636771, TGX-221,

20 AS25242, CAL-101, ZSTK474 y IPI-145.

Otros ejemplos ilustrativos de inhibidores de pan-PI3K incluyen, de modo no taxativo, BEZ235, LY294002, GSK1059615, TG100713 y GDC-0941.

c. Inhibidores de AKT

Tal como se utiliza en la presente, el término «inhibidor de AKT» hace referencia a un ácido nucleico, péptido, compuesto o molécula orgánica pequeña que inhibe al menos una actividad de AKT. Los inhibidores de AKT se pueden agrupar en diversas clases, incluidos inhibidores basados en lípidos (p. ej., inhibidores que se dirigen al dominio de homología de pleckstrina de AKT que evita la localización de AKT en membranas plasmáticas), inhibidores competitivos de ATP e inhibidores alostéricos. En una modalidad, los inhibidores de AKT actúan mediante unión con el lugar catalítico de AKT. En una modalidad particular, los inhibidores de Akt actúan inhibiendo la fosforilación de objetivos de AKT corriente abajo, como mTOR. En otra modalidad, la actividad de AKT se inhibe inhibiendo las señales de entrada para activar Akt mediante inhibición, por ejemplo, de la activación de ADN-PK de AKT, activación de PDK-1 de AKT y/o activación de mTORC2 de Akt.

20

Los inhibidores de AKT pueden dirigirse a las tres isoformas de AKT, AKT1, AKT2, AKT3 o pueden ser selectivos de la isoforma y dirigirse solamente a una o dos de las isoformas de AKT. En una modalidad, un inhibidor de AKT puede dirigirse a AKT, así como

a proteínas adicionales en la vía de PI3K-AKT-mTOR. Un inhibidor de AKT que se dirige solamente a AKT puede indicarse como un inhibidor selectivo de AKT. En una modalidad, puede comprenderse que un inhibidor selectivo de AKT hace referencia a un agente que presenta una concentración inhibidora del 50 % con respecto a AKT, que es al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces o más menor a la IC50 del inhibidor con respecto a otras proteínas en la vía.

10

En una modalidad particular, los ejemplos de inhibidores de AKT inhiben AKT con una IC50 (concentración que inhibe el 50 % de la actividad) de alrededor de 200 nM o menos, preferentemente alrededor de 100 nm o menos, incluso más preferentemente alrededor de 60 nM o menos, alrededor de 25 nM, alrededor de 10 nM, alrededor de 5 nM, alrededor de 1 nM, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 1 μ M, o menos. En una modalidad, un AKT inhibe AKT con una IC50 de entre alrededor de 2 nM y alrededor de 100 nm, más preferentemente entre alrededor de 2 nM y alrededor de 50 nM, incluso más preferentemente entre alrededor de 2 nM y alrededor de 15 nM.

20

Los ejemplos ilustrativos de inhibidores de AKT para uso en combinación con conjugados de anticuerpo-fármaco basados en

auristatina incluyen, por ejemplo, perifosina (Keryx), MK2206 (Merck), VQD-002 (VioQuest), XL418 (Exelixis), GSK690693, GDC-0068 y PX316 (PROLX Pharmaceuticals).

- 5 Un ejemplo ilustrativo y no taxativo de un inhibidor selectivo de Akt1 es A-674563.

Un ejemplo ilustrativo y no taxativo de un inhibidor selectivo de Akt2 es CCT128930.

10

En modalidades particulares, la activación de ADN-PK del inhibidor de Akt de Akt, activación de PDK-1 de Akt, activación de mTORC2 de Akt o activación de HSP de Akt.

- 15 Los ejemplos ilustrativos de inhibidores de ADN-PK incluyen, de modo no taxativo, NU7441, PI-103, NU7026, PIK-75 y PP-121.

d. Inhibidores de mTOR

- 20 Los términos «inhibidor de mTOR» o «agente que inhibe mTOR» hacen referencia a un ácido nucleico, péptido, compuesto o molécula orgánica pequeña que inhibe al menos una actividad de una proteína de mTOR como, por ejemplo, la actividad de la proteína cinasa serina/treonina en al menos uno de sus

sustratos (p. ej., cinasa p70S6 1, 4E-BP1, AKT/PKB y eEF2). Los inhibidores de mTOR pueden unirse directamente a mTORC1, mTORC2 o mTORC1 y mTORC2 e inhibirlos.

5 La inhibición de la actividad de mTORC1 y/o mTORC2 se puede determinar mediante una reducción en la transducción de señal de la vía de PI3K/Akt/mTOR. Se puede utilizar una amplia variedad de lecturas para establecer una reducción del producto de esta vía de señalización. Algunos ejemplos no taxativos de
10 lecturas incluyen (1) una disminución en la fosforilación de Akt en residuos que incluyen, de modo no taxativo, 5473 y T308, (2) una disminución en la activación de Akt según se observa, por ejemplo, mediante una reducción de la fosforilación de sustratos de Akt que incluyen, de modo no taxativo, Fox01/O3a
15 T24/32, GSK3a/ β ; S21/9 y TSC2 T1462, (3) una disminución en la fosforilación de moléculas de señalización corriente abajo de mTOR que incluyen, de modo no taxativo, 70S6K T389, 4EBP1 T37/46 y S6 S240/244 ribosómica y (4) inhibición de la proliferación de células cancerosas.

20

En una modalidad, los inhibidores de mTOR son inhibidores del lugar activo. Estos son inhibidores de mTOR que se unen al lugar de unión a ATP (también indicado como cavidad de unión a ATP) de mTOR e inhiben la actividad catalítica de mTORC1 y

mTORC2. Una clase de inhibidores del lugar activo adecuados para uso en los métodos de fabricación de células T contemplados en la presente son inhibidores de especificidad doble que se dirigen e inhiben directamente a PI3K y mTOR. Los
5 inhibidores de especificidad doble se unen al lugar de unión a ATP de mTOR y PI3K. Los ejemplos ilustrativos de estos inhibidores incluyen, de modo no taxativo: imidazoquinazolinas, wortmannina, LY294002, PI-103 (Cayman Chemical), SF1126 (Semafore), BGT226 (Novartis), XL765 (Exelixis) y NVP-BEZ235
10 (Novartis).

Otra clase de inhibidores del lugar activo de mTOR adecuados para uso en los métodos contemplados en la presente inhibe de forma selectiva la actividad de mTORC1 y mTORC2 con respecto a
15 una o más fosfatidilinositol 3 cinasas tipo I, p. ej., cinasa PI3 α , β , γ o δ . Estos inhibidores del lugar activo se unen al lugar activo de mTOR, pero no PI3K. Los ejemplos ilustrativos de estos inhibidores incluyen, de modo no taxativo: pirazolopirimidinas, Torin1 (Guertin y Sabatini), PP242 (2-(4-amino-1-isopropil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-1H-indol-5-
20 ol), PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth) y AZD8055 (Liu et ál., Nature Review, 8, 627-644, 2009). I

En una modalidad, un inhibidor selectivo de mTOR hace referencia a un agente que presenta una concentración inhibidora del 50 % (IC50) con respecto a mTORC1 y/o mTORC2, que es al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, 5 al menos 100 veces, al menos 1000 veces o más menos a la IC50 del inhibidor con respecto a una, dos, tres o más PI3 cinasas tipo I o a todas las PI3-cinasas de tipo I.

Otra clase de inhibidores de mTOR para uso en la presente 10 invención se indica en la presente como «rapálogos». Tal como se utiliza en la presente, el término «rapálogos» hace referencia a compuestos que se unen de forma específica al dominio FRB de mTOR (dominio de unión a rapamicina RKBP), se encuentran estructuralmente relacionados con rapamicina y 15 retienen las propiedades inhibidoras de mTOR. El término rapálogos excluye rapamicina. Los rapálogos incluyen ésteres, éteres, oximas, hidrazonas e hidroxilaminas de rapamicina, así como compuestos en los que los grupos funcionales en la estructura nuclear de rapamicina se encuentran modificados, por 20 ejemplo, mediante reducción u oxidación. Las sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos también se consideran derivados de rapamicina. Los ejemplos ilustrativos de rapálogos adecuados para uso en los métodos contemplados en la presente incluyen, de modo no taxativo, temsirolimus

(CC1779), everolimus (RAD001), deforolimus (AP23573), AZD8055 (AstraZeneca) y OSI-027 (OSI).

En una modalidad, el agente es el inhibidor de mTOR rapamicina
5 (sirolimus).

En una modalidad particular, los ejemplos de inhibidores de mTOR para uso en la presente invención inhiben mTORC1, mTORC2 o mTORC1 y mTORC2 con una IC50 (concentración que inhibe el 50 %
10 de la actividad) de alrededor de 200 nM o menos, preferentemente alrededor de 100 nm o menos, incluso más preferentemente alrededor de 60 nM o menos, alrededor de 25 nM, alrededor de 10 nM, alrededor de 5 nM, alrededor de 1 nM, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 1 μ M, o menos. En un aspecto, un
15 inhibidor de mTOR para uso en la presente invención inhibe mTORC1, mTORC2 o mTORC1 y mTORC2 con una IC50 de entre alrededor de 2 nM y alrededor de 100 nm, más preferentemente entre alrededor de 2 nM y alrededor de 50 nM, incluso más preferentemente entre alrededor de 2 nM y alrededor de 15 nM.

20

En una modalidad, los ejemplos de inhibidores de mTOR inhiben PI3K y mTORC1 o mTORC2 o ambos de mTORC1 y mTORC2 y PI3K con una IC50 (concentración que inhibe el 50 % de la actividad) de alrededor de 200 nM o menos, preferentemente alrededor de 100

nm o menos, incluso más preferentemente alrededor de 60 nM o menos, alrededor de 25 nM, alrededor de 10 nM, alrededor de 5 nM, alrededor de 1 nM, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 1 μ M, o menos. En un aspecto, un inhibidor de mTOR para uso en la presente invención inhibe PI3K y mTORC1 o mTORC2 o ambos de mTORC1 y mTORC2 y PI3K con una IC50 de entre alrededor de 2 nM y alrededor de 100 nm, más preferentemente entre alrededor de 2 nM y alrededor de 50 nM, incluso más preferentemente entre alrededor de 2 nM y alrededor de 15 nM.

10

Los ejemplos ilustrativos adicionales de inhibidores de mTOR adecuados para uso en modalidades particulares contempladas en la presente incluyen, de modo no taxativo, AZD8055, INK128, rapamicina, PF-04691502 y everolimus.

15

Se ha mostrado que mTOR demuestra una actividad catalítica potente y específica hacia las proteínas del sustrato fisiológico, proteína cinasa ribosómica p70 S6 I (p70S6K1) y proteína de unión a eIF4E 1 (4EBP1), según la medición con anticuerpos específicos del fósforo en transferencia Western.

20

En una modalidad, el inhibidor de la vía de PI3K/AKT/mTOR es un inhibidor de cinasa s6 seleccionado del grupo que consiste en: BI-D1870, H89, PF-4708671, FMK y AT7867.

I. COMPOSICIONES Y FORMULACIONES

Las composiciones contempladas en la presente pueden comprender uno o más polipéptidos, polinucleótidos, vectores que los
5 comprenden, células efectoras inmunes genéticamente modificadas, etc., como se contempla en la presente. Las composiciones incluyen, de modo no taxativo, composiciones farmacéuticas. Una «composición farmacéutica» hace referencia a una composición formulada en soluciones farmacéuticamente
10 aceptables o fisiológicamente aceptables para administración a una célula o un animal, sola o en combinación con una o más modalidades adicionales de terapias. También se comprenderá que, si se desea, las composiciones de la invención se pueden administrar también en combinación con otros agentes como, p.
15 ej., citocinas, factores de crecimiento, hormonas, moléculas pequeñas, quimioterapéuticos, profármacos, fármacos, anticuerpos u otros diversos agentes farmacéuticamente activos. No existe virtualmente ningún límite para otros componentes que también se puedan incluir en las composiciones, siempre que los
20 agentes adicionales no afecten de forma adversa la capacidad de la composición de suministrar la terapia pretendida.

La frase «farmacéuticamente aceptable» se usa en la presente para hacer referencia a los compuestos, los materiales, las

composiciones y/o las formas de dosificación adecuados, dentro del alcance del buen criterio médico, para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin provocar toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación excesivos, según una relación beneficio/riesgo razonable.

Tal como se utiliza en la presente, «portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables» incluye, de modo no taxativo, todo adyuvante, portador, excipiente, emoliente, agente edulcorante, diluyente, conservante, tinte/colorante, potenciador del sabor, tensioactivo, agente humectante, agente de dispersión, agente de suspensión, estabilizante, agente isotónico, solvente, tensioactivo o emulsionante aprobado por la Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos como aceptable para su uso en humanos o animales domésticos. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, de modo no taxativo, azúcares, como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, como almidón de maíz y almidón de papa; celulosa y sus derivados, como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto; malta; gelatina; talco; manteca de cacao, ceras, grasas animales y vegetales, parafinas, siliconas, bentonitas, ácido silícico, óxido de cinc; aceites, como aceite de cacahuete, aceite se

semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, como butilenglicol; polioles, como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, como oleato de etilo y laurato de etilo; ágar; agentes amortiguadores, como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógeno; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones amortiguadoras de fosfato y cualquier otra sustancia compatible que se utilice en composiciones farmacéuticas.

En modalidades particulares, las composiciones de la presente invención comprenden una cantidad de células efectoras inmunes que expresan CAR contempladas en la presente. Tal como se utiliza en la presente, el término «cantidad» hace referencia a «una cantidad eficaz» o «una eficaz cantidad» de una célula terapéutica genéticamente modificada, p. ej., célula T, para lograr un resultado profiláctico o terapéutico deseado o beneficioso, incluidos resultados clínicos.

20

Una «cantidad profilácticamente eficaz» hace referencia a una cantidad de una célula terapéutica genéticamente modificada eficaz para lograr el resultado profiláctico deseado. De forma habitual, pero no necesaria, dado que se utiliza una dosis

profiláctica en los sujetos antes o en una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz es menor a la cantidad terapéuticamente eficaz.

5 Una «cantidad terapéuticamente eficaz» de una célula terapéutica genéticamente modificada puede variar según factores como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, así como la capacidad de las células madre y progenitoras de provocar una respuesta deseada en el
10 individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una cantidad en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del virus o las células terapéuticas transducidas se ve superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. El término «cantidad terapéuticamente eficaz» incluye una cantidad eficaz
15 para «tratar» un sujeto (p. ej., un paciente). Cuando se indica una cantidad terapéutica, un médico puede determinar la cantidad exacta de las composiciones de la presente invención que se debe administrar, teniendo en cuenta las diferencias individuales de edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la
20 infección o metástasis y afección del paciente (sujeto). En general, se puede establecer que una composición farmacéutica que comprenda las células T descrita en la presente se puede administrar en una dosificación de 10^2 a 10^{10} células/kg de peso corporal, preferentemente 10^5 a 10^6 células/kg de peso

corporal, incluidos todos los valores enteros dentro de estos intervalos. La cantidad de células dependerá del uso final para el cual se pretenda la composición, así como el tipo de células que allí se incluyan. Para los usos que se indican en la presente, las células generalmente se encuentran en un volumen de un litro o menos y pueden ser de 500 mL o menos, incluso 250 mL o 100 mL o menos. Por lo tanto, la densidad de las células deseadas típicamente es mayor a 10^6 células/mL y generalmente es superior a 10^7 células/mL, generalmente 10^8 células/mL o superior. La cantidad clínicamente relevante de células inmunes puede prorratearse en múltiples infusiones que acumuladas alcancen o superen 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} o 10^{12} células. En algunos aspectos de la presente invención, en particular dado que todas las células infundidas se redirigen hacia un antígeno objetivo particular (p. ej., cadena ligera κ o λ), se pueden administrar cantidades menores de células, en el intervalo de 10^6 /kilogramo (10^6 - 10^{11} por paciente). Las composiciones celulares con expresión de CAR se pueden administrar múltiples veces en dosis dentro de estos intervalos. Las células pueden ser alogénicas, singénicas, xenogénicas o autólogas para el paciente que se someta a la terapia. Si se desea, el tratamiento también puede incluir administración de mitógenos (p. ej., PHA) o linfocinas, citocinas y/o quimiocinas (p. ej., IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF-

alfa, IL-18 y TNF-beta, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 α , etc.), como se describe en la presente para potenciar la inducción de la respuesta inmunitaria.

5 En general, las composiciones que comprenden las células activadas y expandidas como se describe en la presente se pueden utilizar en el tratamiento y la prevención de enfermedades que surjan en individuos inmunocomprometidos. En particular, las composiciones que comprenden las células T
10 modificadas con CAR contempladas en la presente se utilizan en el tratamiento de neoplasias de células B. Las células T modificadas con CAR de la presente invención se pueden administrar solas o como una composición farmacéutica en combinación con portadores, diluyentes, excipientes y/o con
15 otros componentes como IL-2 u otras citocinas o poblaciones celulares. En modalidades particulares, las composiciones farmacéuticas contempladas en la presente comprenden una cantidad de células T genéticamente modificadas, en combinación con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéutica
20 o fisiológicamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención que comprenden una población de células efectoras inmunes con expresión de CAR, como células T, pueden comprender

amortiguadores como solución salina amortiguada neutra, solución salina amortiguada con fosfato y similares; carbohidratos como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos como glicina; 5 antioxidantes; agentes quelantes como EDTA o glutathione; adyuvantes (p. ej., hidróxido de aluminio) y conservantes. Las composiciones de la presente invención se formulan preferentemente para administración parenteral, p. ej., administración intravascular (intravenosa o intraarterial), 10 intraperitoneal o intramuscular.

Las composiciones farmacéuticas líquidas, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, pueden incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles como agua para inyección, 15 solución salina, preferentemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como medio de suspensión o solvente, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes; agentes antibacterianos como 20 alcohol bencílico o metilparabeno; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfato de sodio; agentes quelantes como ácido etilendiaminotetraacético; amortiguadores como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para ajustar la tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral se puede

colocar en ampollas, jeringas descartables o frascos de dosis múltiples de vidrio o plástico. Una composición farmacéutica inyectable es preferentemente estéril.

5 En una modalidad particular, las composiciones contempladas en la presente comprenden una cantidad eficaz de células efectoras inmunes con expresión de CAR, solas o en combinación con uno o más agentes terapéuticos. Por lo tanto, las composiciones de células efectoras inmunes con expresión de CAR se pueden
10 administrar solas o en combinación con otros tratamientos contra el cáncer, como terapia de radiación, quimioterapia, trasplante, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia fotodinámica, etc. Las composiciones también se pueden administrar en combinación con antibióticos. Estos agentes
15 terapéuticos pueden aceptarse en la técnica como un tratamiento estándar para una enfermedad particular como se describe en la presente, como un cáncer particular. Los ejemplos de agentes terapéuticos que se contemplan incluyen citocinas, factores de crecimiento, esteroides, AINE, FARME, antiinflamatorios,
20 quimioterapéuticos, radioterapéuticos, anticuerpos terapéuticos u otros agentes activos y auxiliares.

En determinadas modalidades, las composiciones que comprenden células efectoras inmunes con expresión de CAR descritas en la

presente se pueden administrar en conjunto con cualquier
 cantidad de agentes quimioterapéuticos. Los ejemplos
 ilustrativos de agentes terapéuticos incluyen agentes
 alquilantes como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™);
 5 sulfonatos de alquilo como busulfán, improsulfán y piposulfán;
 aziridinas como benzodopa, carbocadona, meturedopa y uredopa;
 etileniminas y metilamelaminas, incluidas altretamina,
 trietilenmelamina, trietilenfosforamida,
 trietilentiofosfaoramida y trimetilolomelamina resumidas;
 10 mostazas de nitrógeno como clorambucilo, clornafazina,
 colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina,
 clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina,
 fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo;
 nitrosureas como carmustina, clorozotocina, fotemustina,
 15 lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos como
 aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina,
 bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina,
 caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina,
 daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina,
 20 doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina,
 marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina,
 olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina,
 quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina,
 tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina;

antimetabolitos como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU);
 análogos de ácido fólico como denopterina, metotrexato,
 pteropterina, trimetrexato; análogos de purina como
 fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos
 5 de pirimidina como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina,
 carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina,
 enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos como calusterona,
 propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano,
 testolactona; antiadrenales como aminoglutetimida, mitotano,
 10 trilostano; regeneradores de ácido fólico como ácido frolínico;
 aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico;
 amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina;
 demecolcina; diazicuona; elfomitina; acetato de eliptinio;
 etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinano;
 15 lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina;
 pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-
 etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofirán;
 espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2, 2',2"-
 triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina;
 20 mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano;
 gacitosina; arabinosida («Ara-C»); ciclofosfamida; tiotepa;
 taxoides, p. ej., paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb
 Oncology, Princeton, N.J.) y
 doxetaxel (TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia);

clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina;
 metotrexato; análogos de platino como cisplatino y
 carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP16);
 ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina;
 5 vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina;
 aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de
 topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); derivados
 de ácido retinoico como Targretin™ (bexaroteno),
 Panretin™ (alitretinoína); ONTAK™ (denileukin diftitox);
 10 esperamicinas; capecitabina y sales, ácidos o derivados
 farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.
 También se incluyen en esta definición agentes antihormonales
 que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en
 cánceres, como los antiestrógenos, que incluyen, por ejemplo,
 15 tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben la
 aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno,
 LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston) y antiandrógenos
 como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y
 goserelin y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente
 20 aceptables de cualquiera de los anteriores.

Se pueden utilizar otros diversos agentes terapéuticos en
 conjunto con las composiciones descritas en la presente. En una
 modalidad, la composición que comprende las células efectoras

inmunes que expresan CAR se administra con un agente antiinflamatorio. Los fármacos o agentes antiinflamatorios incluyen, de modo no taxativo, esteroides y glucocorticoides (incluidos etametasona, budesonida, dexametasona, acetato de
5 hidroclorhidrato de hidroclorhidrato de hidroclorhidrato, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) incluidos aspirina, ibuprofeno, naproxeno, metotrexato, sulfasalazina, leflunomida y medicamentos anti-TNF, ciclofosfamida y
10 micofenolato.

Otros ejemplos de AINE se seleccionan del grupo que consiste en ibuprofeno, naproxeno, naproxeno sódico, inhibidores de Cox-2 como VIOXX® (rofecoxib) y CELEBREX® (celecoxib) y sialilatos.
15 Los ejemplos de analgésicos se seleccionan del grupo que consiste en acetaminofeno, oxicodona, tramadol de clorhidrato de propoxifeno. Los ejemplos de glucocorticoides se seleccionan del grupo que consiste en cortisona, dexametasona, hidroclorhidrato de hidroclorhidrato de hidroclorhidrato, metilprednisolona, prednisolona o prednisona.
20 Los ejemplos de modificadores de la respuesta biológica incluyen moléculas dirigidas contra marcadores de la superficie celular (p. ej., CD4, CD5, etc.), inhibidores de citocina, como los antagonistas del TNF (p. ej., etanercept (ENBREL®), adalimumab (HUMIRA®) y infliximab (REMICADE®), inhibidores de

quimiocinas e inhibidores de moléculas de adhesión. Los modificadores de la respuesta biológica incluyen anticuerpos monoclonales, así como formas recombinantes de moléculas. Los ejemplos de FAME incluyen azatioprina, ciclofosfamida, 5 ciclosporina, metotrexato, penicilamina, leflunomida, sulfasalazina, hidroxicloroquina, oro ((auranofina) oral e intramuscular) y minociclina.

Los ejemplos ilustrativos de anticuerpos terapéuticos adecuados 10 para combinación con las células T modificadas con CAR contempladas en la presente incluyen, de modo no taxativo, bavituximab, bevacizumab (avastina), bivatuzumab, blinatumomab, conatumumab, daratumumab, duligotumab, dacetuzumab, dalotuzumab, elotuzumab (HuLuc63), gemtuzumab, ibritumomab, 15 indatuximab, inotuzumab, lorvotuzumab, lucatumumab, milatuzumab, moxetumomab, ocaratuzumab, ofatumumab, rituximab, siltuximab, teprotumumab y ublituximab.

En determinadas modalidades, las composiciones descritas en la 20 presente se administran en conjunto con una citocina. Tal como se utiliza en la presente, «citocina» se incluye como un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan en otra célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de dichas citocinas son

linfocinas, monocinas y hormonas de polipéptidos tradicionales. Incluidas entre las citocinas se encuentran las hormonas de crecimiento como la hormona de crecimiento humano, la hormona de crecimiento humano de N-metionilo y la hormona de crecimiento bovino; la hormona paratiroidea; la tiroxina; la insulina; la proinsulina; la relaxina; la prorrelaxina; las hormonas de glicoproteína como la hormona folículoestimulante (FSH, por su sigla en inglés), la hormona estimulante de la tiroides (TSH, por su sigla en inglés) y la hormona luteinizante (LH, por su sigla en inglés); el factor de crecimiento hepático; el factor de crecimiento de fibroblastos; la prolactina; el lactógeno placentario; el factor de necrosis tumoral alfa y beta; la sustancia inhibidora mulleriana; el péptido asociado con gonadotropina de ratón; la inhibina; la activina; el factor de crecimiento endotelial vascular; la integrina; la trombopoyetina (TPO); los factores de crecimiento nervioso como NGF-beta; el factor de crecimiento de plaquetas; los factores de crecimiento transformadores (TGF, por su sigla en inglés) como TGF-alfa y TGF-beta; el factor de crecimiento tipo insulina I y II; la eritropoyetina (EPO); los factores osteoinductores; los interferones como interferón alfa, beta y gamma; los factores estimulantes de colonias (CSF, por su sigla en inglés) como CSF de macrófagos (M-CSF, por su sigla en inglés); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, por su sigla

en inglés) y CSF de granulocito (G-CSF, por su sigla en inglés); interleucinas (IL) como IL-1, IL-1alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, IL-21, un factor de necrosis tumoral como TNF-alfa o TNF-beta y
5 otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando kit (KL, por su sigla en inglés). Tal como se usa en la presente, el término citocina incluye proteínas de orígenes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia natural.

10

En modalidades particulares, una composición comprende células T de CAR contempladas en la presente que se cultivan en presencia de un inhibidor de PI3K como se describe en la presente y expresan uno o más de los siguientes marcadores:
15 CD3, CD4, CD8, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62, CD127 y HLA-DR se pueden aislar adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. En una modalidad, una composición comprende una subpoblación específica de células T que expresa uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en
20 CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197 y CD38 o CD62L, CD127, CD197 y CD38 se aísla adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. En diversas modalidades, las composiciones no expresan o no expresan de forma sustancial uno o más de los siguientes marcadores: CD57, CD244, CD160, PD-1,

CTLA4, TIM3 y LAG3.

En una modalidad, la expresión de uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD62L, CD127, CD197 y CD38 aumenta al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces o más en comparación con una población de células T activadas y expandidas sin un inhibidor de PI3K.

10

En una modalidad, la expresión de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 y LAG3 disminuye al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces o más en comparación con una población de células T activadas y expandidas con un inhibidor de PI3K.

20 **J. MÉTODOS TERAPÉUTICOS**

Las células efectoras inmunes genéticamente modificadas contempladas en la presente brindan métodos mejorados de inmunoterapia adoptiva para uso en el tratamiento de afecciones relacionadas con células B que incluyen, de modo no taxativo,

afecciones inmunorreguladoras y neoplasias hematológicas.

En modalidades particulares, la especificidad de una célula
efectora inmune primaria se redirige a células B mediante
5 modificación genética de la célula efectora inmune primaria con
un CAR contemplado en la presente. En diversas modalidades, un
vector viral se utiliza para modificar genéticamente una célula
efectora inmune con un polinucleótido particular que codifica
un CAR que comprende un dominio de unión al antígeno anti-BCMA
10 de murino que se une a un polinucleótido de BCMA, un dominio
bisagra, un dominio transmembrana (TM), un enlazador oligo o
polipeptídico corto que enlaza el dominio TM con el dominio de
señalización intracelular del CAR y uno o más dominios de
señalización coestimuladora intracelular y un dominio de
15 señalización primaria.

En una modalidad, la presente invención incluye un tipo de
terapia celular en la que las células T se modifican
genéticamente para expresar un CAR que se dirige a células B
20 con expresión de BCMA. En otra modalidad, las células T de CAR
anti-BCMA se cultivan en presencia de IL-2 y un inhibidor de
PI3K para aumentar las propiedades terapéuticas y la
persistencia de las células T de CAR. Las células T de CAR
luego se infunden en un destinatario que lo necesite. Las

células infundidas pueden destruir las células B que provocan enfermedad en el destinatario. A diferencia de las terapias con anticuerpo, las células T de CAR pueden replicarse *in vivo*, lo que produce persistencia a largo plazo que puede llevar a una
5 terapia sostenida contra el cáncer.

En una modalidad, las células T de CAR de la invención pueden experimentar una fuerte expansión de células T *in vivo* y pueden persistir durante una cantidad de tiempo prolongada. En otra
10 modalidad, las células T de CAR de la invención evolucionan en células T de memoria específicas que pueden reactivarse para inhibir cualquier crecimiento o formación tumoral adicional.

En modalidades particulares, las composiciones que comprenden
15 células efectoras inmunes que comprenden los CAR contemplados en la presente se utilizan en el tratamiento de afecciones asociadas con actividad anormal de células B.

Los ejemplos ilustrativos de afecciones que se pueden tratar,
20 prevenir o mejorar utilizando las células efectoras inmunes que comprenden los CAR contempladas en la presente incluyen, de modo no taxativo: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, miastenia grave, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopenia idiopática, síndrome anti-

fosfolipídico, enfermedad de Chagas, enfermedad de Grave, granulomatosis de Wegener, poliarteritis nodosa, síndrome de Sjogren, pénfigo vulgar, escleroderma, esclerosis múltiple, síndrome antifosfolipídico, vasculitis asociada con ANCA, 5 enfermedad de Goodpasture, enfermedad de Kawasaki y glomerulonefritis de avance rápido.

Las células efectoras inmunes modificadas también se pueden aplicar en trastornos de células plasmáticas como enfermedad de 10 las cadenas pesadas, amiloidosis primaria o asociada con inmunocitos y gammapatía monoclonal de importancia indeterminada (MGUS, por su sigla en inglés).

Tal como se utiliza en la presente, «neoplasia de células B» 15 hace referencia a un tipo de cáncer que se forma en células B (un tipo de célula del sistema inmunológico), como se describe a continuación.

En modalidades particulares, las composiciones que comprenden 20 células T modificadas con CAR contempladas en la presente se utilizan en el tratamiento de neoplasias hematológicas que incluyen, de modo no taxativo, neoplasias de células B como, por ejemplo, mieloma múltiple (MM) y linfoma no Hodgkin (NHL).

El mieloma múltiple es una neoplasia de células B de morfología celular plasmática madura caracterizada por la transformación neoplásica de un único clon de estos tipos de células. Estas células plasmáticas proliferan en BM y pueden invadir los
5 huesos adyacentes y, en algunas oportunidades, la sangre. Diversas formas de mieloma múltiple incluyen mieloma múltiple manifiesto, mieloma múltiple quiescente, leucemia de células plasmáticas, mieloma no secretor, mieloma de IgD, mieloma osteoesclerótico, plasmacitoma solitario de los huesos y
10 plasmacitoma extramedular (remitirse, por ejemplo, Braunwald, et ál. (eds), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15ª edición (McGraw-Hill 2001)).

El linfoma no Hodgkin comprende un gran grupo de cánceres de
15 linfocitos (glóbulos blancos). Los linfomas no Hodgkin pueden producirse a cualquier edad y a menudo se encuentran marcados por nódulos linfáticos más grandes de lo normal, fiebre y pérdida de peso. Existen muchos tipos diferentes de linfoma no Hodgkin. Por ejemplo, el linfoma no Hodgkin se puede dividir en
20 los tipos agresivo (de crecimiento rápido) e indolente (de crecimiento lento). Si bien los linfomas no Hodgkin se pueden derivar de células B y células T, tal como se utilizan en la presente los términos «linfoma no Hodgkin» y «linfoma no Hodgkin de células B» se utilizan de forma intercambiable. Los

- linfomas no Hodgkin de células B (NHL) incluyen linfoma de Burkitt, leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño (LLC/LLP), linfoma de células B grandes difusas, linfoma folicular, linfoma de células grandes inmunoblásticas,
- 5 linfoma linfoblástico B precursor y linfoma de células del manto. Los linfomas que se producen luego de un trasplante de médula ósea o células madre a menudo son linfomas no Hodgkin de células B.
- 10 La leucemia linfocítica crónica (CLL) es un cáncer indolente (de crecimiento lento) que provoca un aumento lento de glóbulos blancos inmaduros que se denominan linfocitos B o células B. Las células cancerosas se esparcen a través de la sangre y la médula ósea y también pueden afectar los nódulos linfáticos u
- 15 otros órganos como el hígado y el bazo. La CLL eventualmente provoca insuficiencia de la médula ósea. Algunas veces, en etapas posteriores de la enfermedad, la enfermedad se denomina linfoma linfocítico pequeño.
- 20 En modalidades particulares, se brindan métodos que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células efectoras inmunes con expresión de CAR contempladas en la presente o una composición que las comprende a un paciente que lo necesite, solas o en combinación con uno o más agentes

terapéuticos. En determinadas modalidades, las células de la invención se utilizan en el tratamiento de pacientes en riesgo de desarrollar una afección asociada con actividad anormal de células B o una neoplasia de células B. Por lo tanto, la presente invención brinda métodos para el tratamiento o la prevención de una afección asociada con actividad anormal de células B o una neoplasia de células B que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de las células modificadas con CAR contempladas en la presente.

Tal como se utilizan en la presente, los términos «individuo» y «sujeto» se utilizan a menudo de forma intercambiable y hacen referencia a cualquier animal que presente un síntoma de una enfermedad, un trastorno o una afección que se pueda tratar con los vectores de terapia génica, los agentes terapéuticos basados en células y los métodos descritos en otros puntos de la presente. En modalidades preferidas, un sujeto incluye cualquier animal que presente síntomas de una enfermedad, un trastorno o una afección del sistema hematopoyético, p. ej., una neoplasia de células B, que se pueda tratar con los vectores de terapia génica, los agentes terapéuticos basados en células y los métodos descritos en otros puntos en la presente. Los sujetos adecuados (p. ej., pacientes) incluyen animales de

laboratorio (como ratón, rata, conejo o cobayo), animales de granja y animales domésticos o mascotas (como un gato o perro). Se incluyen primates no humanos y, preferentemente, pacientes humanos. Los sujetos típicos incluyen pacientes humanos con una
5 neoplasia de células B, con diagnóstico de una neoplasia de células B o en riesgo de padecer o que padecen una neoplasia de células B.

Tal como se utiliza en la presente, el término «paciente» hace
10 referencia a un sujeto diagnosticado con una enfermedad, un trastorno o una afección que se pueda tratar con los vectores de terapia génica, los agentes terapéuticos basados en células y los métodos descritos en otros puntos de la presente.

15 Tal como se utiliza en la presente, «tratamiento» o «tratar» incluye cualquier efecto beneficioso o deseable en los síntomas o la patología de una enfermedad o afección patológica y puede incluir incluso reducciones mínimas en uno o más marcadores ponderables de la enfermedad o afección que se trate. El
20 tratamiento puede implicar opcionalmente la reducción o la mejora de los síntomas de la enfermedad o afección o el retraso del avance de la enfermedad o afección. «Tratamiento» no indica necesariamente erradicación completa o cura de la enfermedad o afección o los síntomas asociados con estas.

Tal como se utiliza en la presente, «prevenir» y palabras similares como «prevenido/a», «prevención», etc., indican un enfoque de prevención, inhibición o reducción de la probabilidad de aparición o recurrencia de una enfermedad o afección. También hace referencia al retraso del inicio o la recurrencia de una enfermedad o afección o el retraso en la aparición o recurrencia de los síntomas de una enfermedad o afección. Tal como se utiliza en la presente, «prevención» y palabras similares también incluye reducción en la intensidad, el efecto, los síntomas y/o la carga de una enfermedad o afección antes del inicio o la recurrencia de la enfermedad o afección.

«Potenciar» o «promover» o «aumentar» o «expandir» hacen referencia en términos generales a la capacidad de una composición contemplada en la presente, p. ej., una célula T genéticamente modificada o un vector que codifique un CAR, de producir, provocar o causar una mayor respuesta fisiológica (es decir, efectos corriente abajo), en comparación con la respuesta provocada por un vehículo o una composición/molécula de control. Una respuesta fisiológica ponderable puede incluir un aumento en la expansión, activación, persistencia de las células T y/o un aumento en la capacidad de destrucción de

células cancerosas, entre otras evidentes en función del conocimiento en la técnica y la descripción en la presente. Una cantidad «aumentada» o «potenciada» es típicamente una cantidad «estadísticamente significativa» y puede incluir un aumento
5 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (p. ej., 500, 1000 veces) (incluidos todos los enteros y puntos decimales intermedios y por encima de 1, p. ej., 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, etc.) la respuesta producida por el vehículo o una composición de control.

10

«Disminución», «menor», «aminorar», «reducir» o «abatir» hacen referencia en términos generales a la capacidad de una composición contemplada en la presente de producir, provocar o causar una respuesta fisiológica menor (es decir, efectos
15 corriente abajo), en comparación con la respuesta que provoca el vehículo o una composición/molécula de control. Una cantidad «menor» o «reducida» es típicamente una cantidad «estadísticamente significativa» y puede incluir una disminución 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20,
20 30 o más veces (p. ej., 500, 1000 veces) (incluidos todos los enteros y puntos decimales intermedio y por encima de 1, p. ej., 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, etc.) la respuesta (respuesta de referencia) producida por el vehículo, una composición de control o la respuesta en un linaje celular particular.

«Mantener», «conservar», «mantenimiento», «sin cambios», «sin cambios sustanciales» o «sin disminución sustancial» hacen referencia en términos generales a la capacidad de una
5 composición contemplada en la presente de producir, provocar o causar una menor respuesta fisiológica (es decir, efectos corriente abajo) en una célula, en comparación con la respuesta provocada por el vehículo, una composición/molécula de control o la respuesta en un linaje celular particular. Una respuesta
10 comparable es una que no sea significativamente diferente o ponderablemente diferente de la respuesta de referencia.

En una modalidad, un método para tratar una afección relacionada con células B en un sujeto que lo necesite
15 comprende administrar una cantidad eficaz, p. ej., cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprenda las células efectoras inmunes genéticamente modificadas contempladas en la presente. La cantidad y frecuencia de administración se determinarán según factores como la afección
20 del paciente y el tipo y la gravedad de la enfermedad del paciente, si bien las dosificaciones apropiadas pueden determinarse mediante ensayos clínicos.

En una modalidad, la cantidad de células T en la composición

que se administra al sujeto es de al menos 0.1×10^5 células,
 al menos 0.5×10^5 células, al menos 1×10^5 células, al menos
 5×10^5 células, al menos 1×10^6 células, al menos 0.5×10^7
 células, al menos 1×10^7 células, al menos 0.5×10^8 células,
 5 al menos 1×10^8 células, al menos 0.5×10^9 células, al menos
 1×10^9 células, al menos 2×10^9 células, al menos 3×10^9
 células, al menos 4×10^9 células, al menos 5×10^9 células o
 al menos 1×10^{10} células. En modalidades particulares, se
 administran alrededor de 1×10^7 CAR células T a alrededor de 1
 10 $\times 10^9$ CAR células T, alrededor de 2×10^7 CAR células T a
 alrededor de 0.9×10^9 CAR células T, alrededor de 3×10^7 CAR
 células T a alrededor de 0.8×10^9 CAR células T, alrededor de
 4×10^7 CAR células T a alrededor de 0.7×10^9 CAR células T,
 alrededor de 5×10^7 CAR células T a alrededor de 0.6×10^9 CAR
 15 células T o alrededor de 5×10^7 CAR células T a alrededor de
 0.5×10^9 CAR células T al sujeto.

En una modalidad, la cantidad de células T en la composición
 que se administra al sujeto es de al menos 0.1×10^4 células/kg
 20 de peso corporal, al menos 0.5×10^4 células/kg de peso
 corporal, al menos 1×10^4 células/kg de peso corporal, al
 menos 5×10^4 células/kg de peso corporal, al menos 1×10^5
 células/kg de peso corporal, al menos 0.5×10^6 células/kg de
 peso corporal, al menos 1×10^6 células/kg de peso corporal, al

menos 0.5×10^7 células/kg de peso corporal, al menos 1×10^7
 células/kg de peso corporal, al menos 0.5×10^8 células/kg de
 peso corporal, al menos 1×10^8 células/kg de peso corporal, al
 menos 2×10^8 células/kg de peso corporal, al menos 3×10^8
 5 células/kg de peso corporal, al menos 4×10^8 células/kg de
 peso corporal, al menos 5×10^8 células/kg de peso corporal o
 al menos 1×10^9 células/kg de peso corporal. En modalidades
 particulares, se administran alrededor de 1×10^6 CAR T
 células/kg de peso corporal a alrededor de 1×10^8 CAR T
 10 células/kg de peso corporal, alrededor de 2×10^6 CAR T
 células/kg de peso corporal a alrededor de 0.9×10^8 CAR T
 células/kg de peso corporal, alrededor de 3×10^6 CAR T
 células/kg de peso corporal a alrededor de 0.8×10^8 CAR T
 células/kg de peso corporal, alrededor de 4×10^6 CAR T
 15 células/kg de peso corporal a alrededor de 0.7×10^8 CAR T
 células/kg de peso corporal, alrededor de 5×10^6 CAR T
 células/kg de peso corporal a alrededor de 0.6×10^8 CAR T
 células/kg de peso corporal o alrededor de 5×10^6 CAR T
 células/kg de peso corporal a alrededor de 0.5×10^8 CAR T
 20 células/kg al sujeto.

El experto en la técnica reconocería que pueden necesitarse
 múltiples administraciones de las composiciones de la invención
 para realizar la terapia deseada. Por ejemplo, una composición

se puede administrar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más veces durante un período de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años, 10 años o más.

5

En determinadas modalidades, puede ser deseable administrar células efectoras inmunes activadas a un sujeto y posteriormente volver a extraerle sangre (o realizar una aféresis), activar las células efectoras inmunes a partir de esta de acuerdo con la presente invención y volver a administrar al paciente por infusión estas células efectoras inmunes activadas y expandidas. Este proceso se puede realizar varias veces cada pocas semanas. En determinadas modalidades, las células efectoras inmunes se pueden activar a partir de 10 extracciones de sangre de 10 cc a 400 cc. En determinadas modalidades, las células efectoras inmunes se activan a partir de extracciones de sangre de 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc, 100 cc, 150 cc, 200 cc, 250 cc, 300 cc, 350 cc o 400 cc o más. Sin deseo de limitarse a la teoría, el uso de este protocolo de múltiples extracciones de 20 sangre/múltiples reinfusiones puede servir para seleccionar determinadas poblaciones de células efectoras inmunes.

La administración de las composiciones contempladas en la

presente se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente incluidos inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implante o trasplante. En una modalidad preferida, las composiciones se administran por vía parenteral. Las frases

5 «administración parenteral» y «administrado/a de forma parenteral», tal como se usan en la presente, se refieren a modos de administración diferentes de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección e incluyen, de modo no taxativo, inyección e infusión intravascular, intravenosa,

10 intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intratumoral, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal e intraesternal. En una modalidad, las composiciones contempladas

15 en la presente se administran a un sujeto mediante inyección directa en un tumor, nódulo linfático o lugar de infección.

En una modalidad, un sujeto que lo necesita recibe una cantidad eficaz de una composición para aumentar una respuesta

20 inmunitaria celular a una afección relacionada con células B en el sujeto. La respuesta inmunitaria puede incluir respuestas inmunitarias celulares mediadas por células T citotóxicas que pueden destruir respuestas de células infectadas, células T reguladoras y células T auxiliares. También se pueden inducir

respuestas inmunitarias humorales, mediadas principalmente por células T auxiliares con la capacidad de activar células B y así llevar a producción de anticuerpos. Se pueden utilizar diversas técnicas para analizar el tipo de respuestas
5 inmunitarias inducidas por las composiciones de la presente invención, que se describen correctamente en la técnica, p. ej., *Current Protocols in Immunology*, editado por: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.

10

En el caso de destrucción mediada por células T, la unión del ligando a CAR inicia la señalización de CAR a la célula T, lo que produce activación de diversas vías de señalización de células T que inducen la producción o liberación de proteínas
15 por parte de las células T que pueden inducir la apoptosis de células objetivo a través de diversos mecanismos. Estos mecanismos mediados por células T incluyen (de modo no taxativo) la transferencia de gránulos citotóxicos intracelulares de la célula T a la célula objetivo, secreción
20 por parte de las células T de citocinas proinflamatorias que puedan inducir la destrucción de células objetivo de forma directa (o de forma indirecta mediante reclutamiento de otras células efectoras destructoras) y regulación en aumento de los ligandos del receptor de muerte (p. ej., FasL) en la superficie

de células T que induce apoptosis de células objetivo luego de la unión a su receptor de muerte cognado (p. ej., Fas) en la célula objetivo.

5 En una modalidad, la invención brinda un método para tratar a un sujeto diagnosticado con una afección relacionada con células B que comprende eliminar las células efectoras inmunes de un sujeto diagnosticado con una afección relacionada con células B con expresión de BCMA, modificar genéticamente dichas
10 células efectoras inmunes con un vector que comprenda un ácido nucleico que codifique un CAR como se contempla en la presente, con lo cual se produce una población de células efectoras inmunes modificadas y administrarle la población de células efectoras inmunes modificadas al mismo sujeto. En una modalidad
15 preferida, las células efectoras inmunes comprenden células T.

En determinadas modalidades, la presente invención también brinda métodos para estimular una respuesta inmunitaria del modulador mediada por células efectoras inmunes a una población
20 de células objetivo en un sujeto que comprenden las etapas de administrarle al sujeto una población de células efectoras inmunes que expresen una construcción de ácido nucleico que codifique una molécula de CAR.

Los métodos para administración de las composiciones celulares descritas en la presente incluyen cualquier método eficaz para producir la reintroducción de células efectoras inmunes genéticamente modificadas *ex vivo* que expresan directamente un
5 CAR de la invención en el sujeto o tras reintroducción de los progenitores genéticamente modificados de células efectoras inmunes que al introducirse a un sujeto se diferencian en células efectoras inmunes maduras que expresan el CAR. Un método comprende transducción de células T de sangre periférica
10 *ex vivo* con una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la invención y retorno de las células transducidas al sujeto.

Todas las publicaciones, solicitudes de patente y patentes emitidas citadas en la presente memoria descriptiva se
15 incorporan a la presente mediante esta referencia como si cada publicación, solicitud de patente o patente emitida individual se indicara específica e individualmente como incorporada mediante esta referencia.

20 Si bien la invención que antecede se describió con cierto de detalle a modo ilustrativo y de ejemplo a los efectos de lograr claridad en la comprensión, será fácilmente evidente para los expertos en la técnica en virtud de las indicaciones de la presente invención que podrán realizarse determinados cambios y

modificaciones en esta sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo ilustrativo y no taxativo. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente diversos parámetros no
5 fundamentales que podrían cambiarse o modificarse para producir resultados esencialmente similares.

EJEMPLOS

10 EJEMPLO 1

CONSTRUCCIÓN DE CAR DE BCMA

Se diseñaron CAR con anticuerpos scFv anti-BCMA de murino para contener un promotor de MND enlazado de forma operativa a scFv anti-BCMA, un dominio bisagra y transmembrana de CD8 α
15 un dominio coestimulador CD137, seguido por el dominio de señalización intracelular de la cadena CD3 ζ . Remitirse, p. ej., a la figura 1. El CAR de BCMA que se muestra en la figura 1 comprende una secuencia del péptido señal (SP, por su sigla en inglés) CD8 α para expresión superficial en
20 células efectoras inmunes. La secuencia de polinucleótidos de un ejemplo de CAR de BCMA se indica en la SEQ ID NO: 10, un ejemplo de secuencias de polipéptidos de un CAR de BCMA se indica en la SEQ ID NO: 9 y un mapa vectorial de un ejemplo de construcción de CAR se muestra en la figura 1. La tabla 3

muestra la identidad, la referencia Genbank, el nombre de origen y la mención para diversos segmentos de nucleótidos de un vector lentiviral de CAR de BCMA.

5 **Tabla 3**

Nucleóti dos	Identidad	Referencia GenBank	Nombre de origen	Mención
1-185	Estructura principal de plásmido pUC19	Registro n.º L09137.2 nt 1 - 185	pUC19	New England Biolabs
185-222	Enlazador	No corresponde	Sintético	No corresponde
223-800	CMV	No corresponde	pHCMV	(1994) PNAS 91: 9564-68
801-1136	R, U5, PBS y secuencias de envoltura	Registro n.º M19921.2 nt 454-789	pNL4-3	Maldarelli, et.ál. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1137-1139	Codón de inicio gag (ATG) cambiado a codón de detención (TAG)	No corresponde	Sintético	No corresponde
1140-1240	Secuencia gag de HIV-1	Registro n.º M19921.2 nt 793-893	pNL4-3	Maldarelli, et.ál. (1991) J Virol: 65(11):5732-43

5	1241-1243	Secuencia gag de HIV-1 cambiada a un segundo codón de detención	No corresponde	Sintético	No corresponde
	1244-1595	Secuencia gag de HIV-1	Registro n.º M19921.2 nt 897-1248	pNL4-3	Maldarelli, et.ál. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
10	1596-1992	HIV-1 pol cPPT/CTS	Registro n.º M19921.2 nt 4745-5125	pNL4-3	Maldarelli, et.ál. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
15	1993-2517	HIV-1, región env HXB3 aislada (RRE)	Registro n.º M14100.1 nt 1875-2399	PgTAT-CMV	Malim, M. H. Nature (1988) 335:181-183
20	2518-2693	Secuencia env de HIV-1 S/A	Registro n.º M19921.2 nt 8290-8470	pNL4-3	Maldarelli, et.ál. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
	2694-2708	Enlazador	No corresponde	Sintético	No corresponde
	2709-3096	MND	No corresponde	pccl-c-MNDU3c-x2	Challita et ál. (1995) J.Virol. 69: 748-755

5	3097-3124	Enlazador	No corresponde	Sintético	No corresponde
	3125-3187	Péptido señal	Registro n.º NM_001768	Péptido señal de CD8a	No corresponde
	3188-3934	BCMA02 scFv (V _L 1-enlazador-V _H 0)	No corresponde	Sintético	No corresponde
10	3935-4141	TM y bisagra CD8a	Registro n.º NM_001768	TM y bisagra CD8a	Milone et ál (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
	4144-4269	Dominio de señalización CD137 (4-1BB)	Registro n.º NM_001561	Dominio de señalización CD137	Milone et ál (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
15	4270-4606	Dominio de señalización CD3-ζ	Registro n.º NM_000734	Dominio de señalización CD3-ζ	Milone et ál (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
	4607-4717	ppt de HIV-1 y parte de U3 3'	Registro n.º M19921.2 nt 9005-9110	pNL4-3	Maldarelli, et.ál. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
20	4718-4834	HIV-1 parte de U3 (eliminación de 399 pb) y R	Registro n.º M19921.2 nt 9511-9627	pNL4-3	Maldarelli, et.ál. (1991) J Virol: 65(11):5732-43

5

4835- 4858	poliA sintética	No corresponde	Sintético	Levitt, N. Genes & Dev (1989) 3:1019-1025
4859- 4877	Enlazador	No corresponde	Sintético	No corresponde
4878- 7350	Estructura principal de pUC19	Registro n.º L09137.2 nt 2636-2686	pUC19	New England Biolabs

10

EJEMPLO 2

EVALUACIÓN DE UN CAR DE BCMA DE MURINO

Introducción

La transferencia adoptiva de células T genéticamente modificadas con receptores de antígeno quimérico (CAR) ha surgido como un enfoque prometedor para tratar los cánceres. Un CAR es una molécula artificial compuesta por un fragmento variable de cadena simple (scFv, por su sigla en inglés) que reacciona con el antígeno, fusionado a dominios de señalización de células T mediante una región transmembrana. En este ejemplo, se evaluó una molécula de CAR específica para el antígeno de maduración de células B (BCMA). El BCMA se expresa en mieloma múltiple, plasmacitoma y algunos linfomas, aunque la expresión normal se limita a células plasmáticas (Avery et ál., 2003; Carpenito et ál., 2009; Chiu

et ál., 2007).

El CAR anti-BCMA02 se construyó utilizando secuencias de un anticuerpo anti-BCMA de ratón (C11D5.3). El CAR anti-BCMA10
 5 se construyó utilizando secuencias modificadas y es una versión «humanizada» del CAR anti-BCMA02. En una serie de ensayos *in vitro*, tanto las células T de CAR anti-BCMA02 como las células T de CAR anti-BCMA10 presentaron especificidad tumoral, expresión de CAR elevada y provocaron una
 10 reactividad potente con respecto a objetivos de expresión de antígeno. Las células T de CAR anti-BCMA02 y las células T de CAR anti-BCMA10 demostraron tener reactividad comparable con las líneas celulares tumorales con expresión de BCMA. Si bien tanto las células T de CAR anti-BCMA02 como las células T de
 15 CAR anti-BCMA10 fueron capaces de provocar regresiones en un modelo tumoral de ratón, las células T de CAR anti-BCMA10 presentaron secreción de citocinas inflamatorias independiente del antígeno y, por lo tanto, tienen el potencial de provocar toxicidades clínicas asociadas con
 20 niveles elevados de citocinas.

Resultados

Liberación tónica de citocinas inflamatorias a partir de células T anti-BCMA10 asociadas con la apoptosis

La proteína de BCMA se puede detectar en el suero de pacientes con mieloma múltiple (Sanchez *et ál.*, 2012). El BCMA sérico promedio en pacientes con mieloma múltiple fue de 10 ng/mL, pero alcanzó un pico de niveles de hasta 100 ng/mL.

5 Se evaluó el impacto de los niveles fisiológicos de BCMA soluble en los candidatos de células T de CAR anti-BCMA.

Se examinó la liberación de IFN γ de células T de CAR anti-BCMA02, células T de CAR anti-BCMA10 y células T de CAR19 Δ

10 luego de un cultivo de 24 horas con BCMA soluble (figura 2a). Las células T de CAR anti-BCMA02 respondieron con liberación mínima de citocinas luego de un cultivo de 24 horas con hasta 1 ug/mL de BCMA. Por el contrario, las células T de CAR anti-BCMA10 respondieron con mayores niveles de IFN γ que fueron

15 proporcionales a la concentración de BCMA soluble que se agregó al cultivo. A 100 ng/mL de BCMA, los niveles máximos indicados en pacientes con mieloma múltiple, las células T de CAR anti-BCMA10 secretaron 82.1 ng/ml de IFN γ , en comparación con 28.8 ng/ml de IFN γ secretados por las células T de CAR

20 anti-BCMA02. El IFN γ se detectó incluso en diversos experimentos de cultivo conjunto con células T de CAR anti-BCMA10 más líneas celulares de control que carecían de antígeno BCMA (figura 2b, cultivo conjunto K562). Estos datos sugirieron que las células T de CAR anti-BCMA10 tenían una

mayor sensibilidad a la estimulación con BCMA soluble y el potencial de respuestas de citocina independientes del antígeno en células T.

5 Se examinó el potencial de secreción tónica de citocinas de células T de CAR anti-BCMA02, células T de CAR anti-BCMA10 (10 días después del inicio del cultivo) y células T de CAR19 Δ . Luego de fabricar células T de CAR, se analizaron medios de cultivo de célula T de CAR anti-BCMA02, célula T de
10 CAR anti-BCMA10 y célula T de CAR19 Δ para determinar la presencia de citocinas inflamatorias. Pese a la ausencia de estimulación antigénica, los cultivos de células T de CAR anti-BCMA10 contenían más de 10 ng/mL de IFN γ en comparación con menos de 1 ng/mL de IFN γ en los cultivos de células T de
15 CAR anti-BCMA02 (figura 3). Los cultivos de células T de CAR anti-BCMA10 también contenían considerablemente ($p < 0.001$) más TNF α . Para cuantificar adicionalmente la cantidad de citocina producida por las células T de CAR anti-BCMA10 sin estimulación antigénica, se midió la liberación de citocina a
20 partir de 5×10^4 células T de CAR durante un cultivo de 24 horas. Las células T de CAR anti-BCMA10 produjeron cantidades considerablemente mayores de citocinas inflamatorias MIP1 α , IFN γ , GMCSF, MIP1 β , IL-8 y TNF α en comparación con las células T de CAR anti-BCMA02 (figura 4, $p < 0.0001$). Las

concentraciones de MIP1 α e IFN γ fueron las mayores entre todas las citocinas examinadas. Las células T de CAR anti-BCMA10 produjeron 4.7 ng de MIP1 α /5 x 10⁴ células/24 horas, 3.0 ng IFN γ /5 x 10⁴ células/24 horas y ~1ng/5 x 10⁴ células/24
5 horas o menos de las otras citocinas. No se detectaron diferencias considerables en las citocinas antiinflamatorias IL-10, IL-2 e IL-4.

Se midió la expresión de marcadores fenotípicos de activación de células T al final de la elaboración de células T de CAR anti-BCMA10 para examinar si la secreción tónica de citocinas inflamatorias indicaba un estado hiperactivo en las células T de CAR anti-BCMA10. HLA-DR y CD25 son marcadores de superficie que normalmente presentan una expresión pico 12-24
10 horas después de la activación de células T y luego disminuyen con el tiempo. Las células T de CAR preparadas a partir de tres donantes normales mostraron que un promedio de 40 $\pm$ 2 % de células T de CAR anti-BCMA02 presentaba HLA-DR. La expresión de HLA-DR en estas células fue comparable a células
15 T sin transducción (43 $\pm$ 2.3 %) y células T de control CAR19 Δ (32 $\pm$ 2.2 %). Por el contrario, 88 $\pm$ 1.2 % de las células T de CAR anti-BCMA10 expresó HLA-DR (figura 5). La expresión de otro marcador de activación CD25 también fue mayor en las células T de CAR anti-BCMA10 en comparación con las células T
20

de CAR anti-BCMA02 (53 ± 0.9 % contra 35 ± 2.4 %). Por lo tanto, las células T de CAR anti-BCMA10 presentaron características fenotípicas de células T activadas sin antígenos agregados.

5 La hiperactividad en las células T a menudo se asocia con muerte celular inducida por activación (AICD, por su sigla en inglés) mediante apoptosis. Se midieron los niveles de caspasa 3 activada para examinar si la hiperactividad de las células T de CAR anti-BCMA10 podría producir mayores niveles
10 apoptóticos en comparación las células T de CAR anti-BCMA02. El 48 % de las células T de CAR anti-BCMA10 de dos donantes tuvo caspasa-3 activa, en comparación con el 16 % de las células T de CAR anti-BCMA02 (figura 6). Por lo tanto, sin antígeno BCMA agregado, las células T de CAR anti-BCMA10
15 contenían una mayor frecuencia de células apoptóticas asociada con mayor activación y secreción de citocinas inflamatorias en comparación con las células T de CAR anti-BCMA02.

20 Las células T de CAR anti-BCMA02 y las células T de CAR anti-BCMA10 se evaluaron para determinar si las células T de CAR podrían responder de forma selectiva a niveles bajos de BCMA o podrían tener reactividad cruzada con un antígeno no relacionado en el suero humano utilizado para cultivo de

células T. Las células T de CAR anti-BCMA02 y las células T de CAR anti-BCMA10 se mantuvieron en medio sin suero humano durante dos días y luego se cambiaron a medio con suero bovino fetal (FBS), suero humano (HABS) o HABS con o sin 100 ng/mL de BCMA soluble (figura 7). Se analizó la liberación de IFN γ 24 horas después mediante ELISA. Tanto las células T de CAR anti-BCMA02 como las células T de CAR anti-BCMA10 respondieron al BCMA soluble. No obstante, las células T de CAR anti-BCMA10 secretaron 10 veces más IFN γ que las células T de CAR anti-BCMA02. En ausencia de BCMA, solamente las células T de CAR anti-BCMA10 liberaron IFN γ , independientemente del cultivo en suero bovino fetal (FBS) ($p=0.0002$) o suero AB humano (HABS) ($p=0.0007$). Estos datos sugirieron que la secreción de citocinas inflamatorias era intrínseca de las células T de CAR anti-BCMA10.

Función antitumoral inferior de células T de CAR anti-BCMA10 en un modelo de mieloma múltiple de ratón

La hiperactivación y la mayor apoptosis podrían tener un impacto negativo en la persistencia de células T de CAR en los pacientes y, en última instancia, en la eficacia clínica. Se examinó la función antitumoral de células T de CAR anti-BCMA02 y células T de CAR anti-BCMA10 en un modelo de tumor en ratón. Se trataron ratones NOD scid gamma (NSG) con

tumores de $\sim 100 \text{ mm}^3$ e mieloma múltiple humano subcutáneo experimental de (RPMI-8226) con 10^7 células T de CAR02 anti-BCMA, 10^7 células T de CAR anti-BCMA10 o Bortezomib (velcade). El crecimiento de RPMI-8226 se supervisó con calibradores. En dos experimentos independientes (figuras 8a y 8b), se comparó el crecimiento tumoral controlado con Bortezomib con los animales con control de vehículo. Los animales con transferencia adoptiva con células T de CAR anti-BCMA02 presentaron una depuración tumoral rápida y duradera (las gráficas insertadas aumentan las regresiones tumorales tempranas). La transferencia adoptiva de células T de CAR anti-BCMA10 también provocó regresiones tumorales, pero se retrasó en ambos experimentos en comparación con las células T de CAR anti-BCMA02.

15

Conclusiones

Las células T de CAR anti-BCMA02 y las células T de CAR anti-BCMA10 presentaron función antitumoral comparable en ensayos in vitro, pero las células T de CAR anti-BCMA10 tuvieron características que podrían tener un impacto negativo en la seguridad y eficacia en el tratamiento de los pacientes. Las células T de CAR anti-BCMA10 respondieron de forma potente con secreción de citocinas inflamatorias luego de exposición a niveles fisiológicos de proteína de BCMA. La tormenta de

20

citocinas o el síndrome de liberación de citocinas es una toxicidad clínica conocida asociada con terapias con células T de CAR. Las preocupaciones con respecto a la liberación de citocinas en BCMA empeoraron luego de la observación de actividad tónica de células T de CAR anti-BCMA10. Incluso en ausencia de estimulación del antígeno, las células T de CAR anti-BCMA10 liberaron niveles elevados de citocinas inflamatorias. La secreción persistente de citocinas tiene el potencial de provocar toxicidades clínicas sustanciales, así como tener un impacto negativo en la función antitumoral. Efectivamente, se descubrió una mayor composición de células apoptóticas y una función antitumoral inferior en células T de CAR anti-BCMA10 en comparación con cultivos de células T de CAR anti-BCMA02 en un modelo de mieloma múltiple de ratón.

15

Referencias

- Avery et ál., (2003). *BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. J Clin Invest*, 112(2), 286-297.
- 20 Carpenito et ál., (2009). *Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. Proc Natl Acad Sci EUA*, 106(9), 3360-3365.
- Chiu et ál., (2007). *Hodgkin lymphoma cells express TACI and*

BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. Blood, 109(2), 729-739.

Sanchez et ál. (2012). *Serum B-cell maturation antigen is elevated in multiple myeloma and correlates with disease status and survival. Br J Haematol, 158(6), 727-738.*

EJEMPLO 3

LA EXPRESIÓN MÍNIMA DE BCMA EN LINFOMAS ACTIVA LAS CÉLULAS T DE CAR ANTI-BCMA

Se midió el nivel de expresión de BCMA en líneas celulares de linfoma y leucemia (Daudi y Raji) para determinar si la expresión era suficiente para activar las células T de CAR anti-BCMA02.

Se cuantificó la expresión de BCMA en células de linfoma, leucemia y mieloma múltiple utilizando citometría de flujo. En este ensayo, se analizó la expresión de BCMA relativa en las células mediante correlación de la intensidad de fluorescencia de la expresión de BCMA con una cantidad conocida de anticuerpos enlazados (capacidad de unión al anticuerpo, ABC, por su sigla en inglés). Los niveles de expresión de BCMA en las líneas de células de linfoma se compararon con los niveles de expresión de BCMA de una línea

celular de mieloma múltiple (RPMI-8226) que se sabe que activa las células T de CAR anti-BCMA02. Se expresaron 12590±1275 moléculas de BCMA02 en la superficie de células RPMI-8226. Por el contrario, las células de Daudi expresaron 5 1173±234 moléculas de BCMA02 y las células JeKo-1 (una línea celular de linfoma de células del manto) expresaron solamente 222±138 moléculas de BCMA02 (figura 9, círculos).

En otro conjunto de experimentos, se analizó la actividad de 10 células T de CAR anti-BCMA02 con respecto a los niveles diminutos de BCMA observados en líneas celulares de linfoma y leucemia (figura 9, recuadros). Se generaron células T de CAR anti-BCMA02 utilizando métodos estándar y la actividad se evaluó mediante ELISA de IFN γ luego del cultivo conjunto con 15 líneas celulares tumorales positivas para BCMA y negativas para BCMA. La reactividad de las células T de CAR anti-BCMA02 tuvo correlación con la cantidad relativa de expresión de ARNm de BCMA (por encima de un umbral) y/o la densidad del receptor de BCMA en la superficie de diversas líneas 20 celulares tumorales luego del cultivo conjunto (figura 9). La liberación de IFN γ fue escasa, si no nula, luego del cultivo conjunto de células T de CAR de BCMA con líneas celulares tumorales negativas para BCMA (BCMA-): leucemia mielógena (K562), leucemia linfoblástica aguda (NALM-6 y NALM-16),

linfoma de células del manto (REC-1) o linfoma de Hodgkin (HDLM-2). Por el contrario, se liberaron cantidades sustanciales de IFN γ luego del cultivo conjunto de células T de CAR de BCMA02 con líneas celulares tumorales positivas para BCMA (BCMA+): leucemia linfoblástica crónica de células B (MEC-1), linfoma de células del manto (JeKo-1), linfoma de Hodgkin (RPMI-6666), linfoma de Burkitt (células de Daudi y células de Ramos) y mieloma múltiple (RPMI-8226).

La reactividad de las células T de CAR anti-BCMA02 con respecto a células de linfoma de Burkitt con expresión de BCMA (células de Daudi) se extendió a estudios animales *in vivo*. Las células de Daudi también expresan CD19. La actividad *in vivo* de células T de CAR anti-BCMA02 se comparó con la actividad *in vivo* de células T de CAR anti-CD19. Ratones NOD scid gamma (NSG) recibieron inyecciones IV con 2×10^6 células de Daudi y se dejó que acumularan una gran carga tumoral sistémica antes de tratarse con células T de CAR. Las células T de CAR se administraron 8 días y 18 días después de la inducción tumoral (figuras 10A y 10B, respectivamente). El vehículo y el control negativo (células T de CAR anti-CD19 Δ) no lograron evitar el crecimiento tumoral, como se observa mediante aumentos de fase logarítmica en la bioluminiscencia, lo cual produjo pérdida

de peso y muerte (figura 10A, dos paneles de ratón más hacia la izquierda). Las células T de CAR anti-CD19 y anti-BCMA02 evitaron el crecimiento tumoral, lo que produjo mantenimiento del peso corporal y supervivencia. Las células T de CAR anti-
5 CD19 y anti-BCMA02 fueron igualmente eficaces al administrarse en el día 8 (figura 10A, dos paneles ratones más hacia la derecha). Las células T de CAR anti-BCMA02 también fueron eficaces en la disminución de la carga tumoral al administrarse a los 18 días de la inducción tumoral.
10 Figura 10B, panel más hacia la derecha.

EJEMPLO 4

ACTIVIDAD *IN VITRO* POTENTE DE CÉLULAS T DE CAR ANTI-BCMA

Se logró actividad potente *in vitro* de células T de CAR anti-
15 BCMA02 con una reducción del 50 por ciento en la expresión de CAR anti-BCMA02. Las poblaciones de células T se transdujeron con entre 4×10^8 y 5×10^7 unidades de transducción de un lentivirus con codificación de una molécula de CAR anti-BCMA02. Las poblaciones de células T resultantes mostraron
20 menor frecuencia de células T de CAR anti-BCMA02 (analizadas como porcentaje positivo) y menor expresión de moléculas de CAR anti-BCMA02 (analizadas como intensidad de fluorescencia media: MFI, por su sigla en inglés).

Se determinó el impacto de una menor expresión de la molécula de CAR en la actividad anti-BCMA02. La frecuencia de células T positivas para CAR anti-BCMA se normalizó con células T sin transducción para contener 26 ± 4 % de células T con reacción a BCMA (figura 11A). La MFI de las células T de CAR anti-BCMA02 normalizadas osciló entre 885 y 1875 (figura 11B). K562 es una línea celular de CML que carece de expresión de BCMA. Las células K562 se modificaron para expresar BCMA y se utilizaron en un ensayo citolítico in vitro para evaluar la actividad de células T de CAR anti-BCMA02 con expresión variada de CAR de BCMA (figura 11C). Las células K562 se etiquetaron con traza celular violeta, mientras que las células K562 con expresión estable de BCMA (K562-BCMA) se etiquetaron con CFSE. Las células T, células K562 y células K562-BCMA se extrajeron, se lavaron y se volvieron a suspender en medio sin citocinas exógenas. Las células se cultivaron a una relación 20:1 o 10:1 de efector (E, célula T) a objetivo (T, mezcla 1:1 de células K562 y K562 BCMA) durante 4 h en una incubadora a 37 °C con CO₂ al 5 %. Las células luego se tiñeron con vida/muerte y se analizaron mediante un FACS. La citotoxicidad se determinó según la diferencia en la relación de células K562:K562-BCMA normalizada para condiciones sin células T.

EJEMPLO 5

PROCESO DE ELABORACIÓN DE CÉLULAS T DE CAR ANTI-BCMA

Se elaboran productos de células T de CAR anti-BCMA02 exclusivos para cada tratamiento de paciente. La
5 confiabilidad del proceso de elaboración de productos de células T de CAR anti-BCMA02 se evaluó generando células T de CAR anti-BCMA02 a partir de 11 PBMC de donantes normales individuales. La expansión de las células T de CAR anti-BCMA02 de cada donante fue comparable a un cultivo sin
10 transducción emparejado realizado en paralelo (figura 12A).

Al final del período de cultivo (día 10), se evaluó la eficacia de la transducción de células T cuantificando la cantidad de lentivirus integrados con qPCR y conjuntos de
15 cebadores específicos lentivirales (cantidad de copias de vector, VCN, por su sigla en inglés). Los cultivos de células T de CAR anti-BCMA02 de 11 donantes mostraron eficacia de transducción lentiviral comparable (figura 12B). La frecuencia de las células T positivas para CAR anti-BCMA02 se
20 midió con citometría de flujo y se descubrió que la expresión de BCMA era comparable en todos los donantes (figura 12C).

Se evaluó la actividad de cada producto de célula T de CAR anti-BCMA02 mediante liberación de IFN γ luego del cultivo

conjunto con células K562 modificadas para expresar BCMA. Todos los productos de células T de CAR02 anti-BCMA presentaron niveles terapéuticamente relevantes de liberación de IFN γ al exponerse a células K562 con expresión de BCMA
 5 (figura 12D).

EJEMPLO 6

EXPRESIÓN DE CD62L, CD127, CD197 Y CD38 EN CÉLULAS T DE CAR TRATADAS
 CON IL-2 o IL-2 Y ZSTK474

10 Las células T de CAR cultivadas con IL-2 y ZSTK474 mostraron mayor expresión de CD62L en comparación con las células T de CAR cultivadas solo con IL-2. Se realizó un análisis de expresión de 29 marcadores de superficie celular adicionales en células T de CAR anti-BCMA02 cultivadas con IL-2 y ZSTK474
 15 utilizando citometría de masa de parámetros múltiples (CyTOF) y comparación con las células T de CAR cultivadas solo en IL-2. Tres marcadores adicionales (CD127, CD197 y CD38) mostraron mayor expresión en las células T de CAR tratadas con IL-2 + ZSTK474 en comparación con las células T de CAR
 20 tratadas solo con IL-2. Por lo tanto, la expresión conjunta de CD62L, CD127, CD197 y CD38 estratificó adicionalmente las células T de CAR cultivadas con ZSTK474. Luego del cultivo en medio con IL-2, 7.44 % de las T de CAR anti-BCMA02 expresó de forma conjunta CD127, CD197 y CD38 en comparación con 24.5 %

de las células T de CAR anti-BCMA02 cultivadas con IL-2 y ZSTK474. El diagrama de Venn en la figura 13 ilustra la expresión conjunta de CD127, CD197 y CD38 en células T anti-BCMA02 positivas para CD62L.

5

EJEMPLO 7

EL TRATAMIENTO CON ZSTK474 AUMENTA LA FRECUENCIA DE LAS CÉLULAS T DE CD8

Se cuantificó la expresión de CD8 en células T de CAR anti-BCMA02 tratadas solo con IL-2 o IL-2 y ZSTK474. La expresión

10 de CD8 se determinó utilizando un anticuerpo anti-CD8 etiquetado de forma fluorescente y citometría de flujo. Las células T de CAR anti-BCMA02 de siete donantes normales cultivadas con IL-2 y ZSTK474 tuvieron una expresión significativamente mayor de CD8 en comparación con las

15 células T de CAR anti-BCMA02 cultivadas solo con IL-2. Figura 14.

EJEMPLO 8

FALTA DE ACTIVIDAD INDEPENDIENTE DEL ANTÍGENO EN CÉLULAS T DE CAR ANTI-

20 BCMA TRATADAS CON ZSTK474

La actividad tónica de las células T de CAR sin antígeno se ha asociado con una menor actividad biológica. La actividad tónica de las células T de CAR anti-BCMA02 se evaluó cuantificando la liberación de interferón- γ (IFN- γ) sin

antígeno, luego de cultivo en presencia de IL-2 y ZSTK474, en comparación con condiciones de cultivo estándares solo con IL-2. Los cultivos de células T de CAR anti-BCMA se prepararon utilizando un sistema directamente aumentable para
5 procesos de fabricación clínica de entidad. En resumen, se cultivaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en matraces estáticos en medio con IL-2 (CellGenix) y anticuerpos específicos para CD3 y CD28 (Miltenyi Biotec). Se agregaron 2×10^8 unidades de transducción de lentivirus que
10 codifica CAR anti-BCMA un día después del inicio del cultivo.

Las células T de CAR anti-BCMA02 se mantuvieron en fase logarítmica agregando medio fresco con IL-2 y una dosis optimizada de ZSTK474 para un total de diez días de cultivo.
15 Al final del período de elaboración, se volvió a cultivar una cantidad equivalente de células T de CAR anti-BCMA02 durante 24 horas solamente en medio. La cantidad de IFN- γ liberado en 24 horas se cuantificó mediante ELISA. En este ensayo, los niveles de IFN- γ por debajo de 200 pg/mL no representan
20 actividad tónica. La figura 15 muestra que la cantidad de IFN- γ liberado por las células T de CAR anti-BCMA02 de 14 donantes es coherente con la falta de actividad tónica, independientemente de que las células T de CAR se cultiven o no con ZSTK474.

EJEMPLO 9

LAS CÉLULAS T DE CAR ANTI-BCMA02 TRATADAS CON ZSTK474 MUESTRAN ACTIVIDAD
TERAPÉUTICA EN UN MODELO TUMORAL DE LINFOMA

5 Se utilizaron tumores de Daudi para cuestionar la actividad
antitumoral de las células T de CAR anti-BCMA02 cultivadas
con IL-2 o IL-2 y ZSTK474. Las células de Daudi expresan un
nivel bajo de proteína de BCMA y brindan un modelo tumoral de
linfoma agresivo y difícil de tratar.

10

Se etiquetaron 2×10^6 células tumorales de Daudi con un gen
de luciferasa de luciérnaga y se inyectaron en ratones NOD
scid con silenciamiento de cadena gamma del receptor de IL-2
(NSG) mediante inyección intravenosa. Luego de permitir la
15 formación de los tumores, se inyectaron 1×10^7 células T de
CAR en los ratones con tumor. Los ratones recibieron
inyecciones de i) células T de CAR anti-BCMA02 tratadas
durante diez días con IL-2 o IL-2 y ZSTK474 o ii) una célula
T de CAR anti-BCMA02 deficiente para señalización trunca
20 (tBCMA02) tratada durante diez días con IL-2 y ZSTK474. Se
supervisó el crecimiento tumoral mediante bioluminiscencia
utilizando un sistema de imagenología Xenogen-IVIS.

Se observó regresión completa del tumor en el 50 % de los

ratones que recibieron las células T de CAR anti-BCMA02 tratadas con IL-2 y ZSTK474. Figura 16.

EJEMPLO 10

5 LAS CÉLULAS T DE CAR TRATADAS CON ZSTK474 MOSTRARON ACTIVIDAD TERAPÉUTICA
EN UN MODELO DE RATÓN DE MIELOMA HUMANO

Animales con tumores de mieloma múltiple subcutáneos de 100 mm³ (RPMI-8226) recibieron infusiones de dosis equivalentes de células T de CAR (1x10⁶ células T positivas para CAR anti-
10 BCMA02) o células T sin modificar de un donante de células T en correspondencia (sin transducción). Las células T de CAR anti-BCMA se trataron con IL-2 o IL-2 y ZSTK474 como se describió en el ejemplo 8.

15 Los animales tratados con células T de CAR anti-BCMA02 cultivadas con IL-2 o IL-2 y ZSTK474 evitaron por completo el sobrecrecimiento tumoral. Figura 17. Por el contrario, los animales tratados con ausencia de transducción o vehículo no pudieron controlar el crecimiento tumoral. Figura 17.

20

En general, en las siguientes reivindicaciones, los términos usados no deberían ser interpretados como limitantes de las reivindicaciones a las modalidades específicamente descritas en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, sino que

debería entenderse que incluyen todas las modalidades posibles con el alcance total de equivalentes a los que tienen derecho tales reivindicaciones. Por consiguiente, las reivindicaciones no se ven limitadas por la descripción.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2017/0006808
Recibo: 19-35106
Fecha: 06/05/2019

CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO
CC: 66.783.790
Pago PSE No: 283275
CUS: 443130440

Patente PCT
RECEPTORES DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS DE BCMA

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-01	Solicitud examen de patentabilidad Patente de Invención (DESCUENTO INTERNET)	1	\$ 1,097,600	\$ 1,097,600
TOTAL					\$ 1,097,600